



Avaliação da tolerância ao selénio de diferentes espécies de leveduras em ensaios de fermentação

Mónica Alexandra da Silva Assunção

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientadora: Doutora Maria Margarida Baleiras dos Santos Couto

Co-orientadora: Doutora Maria Luísa Louro Martins

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Maria Margarida Baleiras dos Santos Couto, Técnica Superior do Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I.P./INIA - Dois Portos;

Doutora Sofia Cristina Gomes Catarino, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I.P./INIA - Dois Portos.

Lisboa, 2011

Aos meus pais

O presente trabalho foi realizado no Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I.P./INIA – Dois Portos e no Instituto Superior de Agronomia. A execução da análise mineral por ICP-MS foi gentilmente realizada pela Doutora Sofia Catarino (INRB, I.P./INIA – Dois Portos).

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi possível com o apoio e colaboração de um grande número de pessoas, que directa ou indirectamente me ajudaram a quem expresso o meu sincero agradecimento.

À minha orientadora, Doutora Margarida Baleiras Couto, Coordenadora do Centro de Actividades de Viticultura e Enologia do INIA – Dois Portos, por ter aceitado a orientação deste trabalho, pela simpatia, pela paciência e por toda a disponibilidade demonstrada para esclarecer as minhas dúvidas e por tudo aquilo que fez para que este trabalho decorresse sempre da melhor forma possível.

À minha co-orientadora Professora Luísa Louro pela simpatia, pela disponibilidade demonstrada para esclarecer as minhas dúvidas e pelo apoio demonstrado em todas as dificuldades que surgiram durante a execução deste trabalho.

Ao Professor Miguel Mourato, pelo apoio ao longo deste trabalho e pela ajuda no tratamento estatístico dos dados.

À Doutora Sofia Catarino pela simpatia, pela disponibilidade demonstrada para esclarecer as minhas dúvidas e pela execução da análise mineral.

À Andreia pela ajuda prestada no Laboratório de Microbiologia. À Patrícia Martins pela ajuda na digestão das amostras. À Marta, Sara e Daniela (companheira de aquário) pela boa disposição constante e por todo o encorajamento.

Às funcionárias do Laboratório Central do INIA - Dois Portos pela disponibilidade de meios para a realização das análises físico-químicas.

À Rafaela Reis pela preciosa ajuda na determinação da actividade enzimática e às restantes meninas do Lab.17A do ISA, pelos bons momentos que passámos e pelo o apoio demonstrado em todas as dificuldades que surgiram.

A todos os funcionários do INRB, I.P./INIA – Dois Portos, por todo o apoio recebido e pela fantástica maneira como me acolheram.

À minha família, especialmente aos meus pais, avós e padrinhos agradeço a compreensão, o apoio e carinho transmitidos ao longo deste percurso.

A todos os meus amigos, em especial Paula Gomes, Rita Vieira Dias e Avril Chiché pelos bons momentos que passámos durante estes 5 anos e que vão deixar muitas saudades.

A todos, **MUITO OBRIGADA.**

RESUMO

A utilização de suplementos nutricionais na dieta alimentar é uma prática comum para colmatar carências nutricionais. O selénio é utilizado como suplemento tendo um papel antioxidante e anti-cancerígeno. Alguns destes suplementos baseiam-se na utilização de leveduras pré-enriquecidas com este mineral.

Este trabalho teve como objectivo estudar a tolerância de diversas estirpes de leveduras ao selénio e avaliar a possibilidade de produzir vinho usando leveduras pré-enriquecidas em selénio.

Os ensaios de viabilidade celular demonstraram que a levedura com melhor desempenho pertence à espécie *Torulaspora delbrueckii*, para níveis de selénio de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A determinação dos teores de proteína e da actividade das enzimas antioxidativas demonstraram que a resposta ao efeito tóxico do selénio varia entre as espécies testadas e é função da concentração de selénio aplicada, sendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* a que apresentou melhor resposta.

As fermentações em mosto com as leveduras *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* sem selénio e pré-enriquecidas em selénio decorreram durante 25 dias. O mosto fermentado obtido a partir da levedura *S. cerevisiae* pré-enriquecida em selénio apresentou uma maior concentração de selénio. Os níveis de açúcares e de etanol atingidos levam a concluir que a levedura *S. cerevisiae* permitiu obter uma fermentação mais completa.

Palavras-chave: Selénio, leveduras, stresse oxidativo, fermentação, mosto, vinho.

ABSTRACT

The use of nutritional supplements in the diet is a common practice to address nutritional deficiencies. Selenium is an essential micronutrient with an antioxidant and anti-carcinogenic role in human and animal health. Some of the supplements used are based on the use of pre-enriched yeast.

This work aimed to study the tolerance of different yeast strains to selenium and to evaluate the possibility of producing wine using selenium-enriched yeast cells.

Cell viability assays demonstrated that the yeast with the best performance belongs to the species *Torulaspora delbrueckii* for the tested levels of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of selenium. The determination of protein levels and antioxidant enzyme activities showed that the response to the toxic effect of selenium varies among species and is a result of the concentration of selenium applied. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* showed the best answer to the tested conditions.

The fermentations in grape must with *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* without selenium and selenium-enriched cells took place over 25 days. The fermented must obtained from the yeast *S. cerevisiae* selenium-enriched presented the highest concentration of selenium. The levels of sugar and ethanol achieved, lead to the conclusion that the yeast *S. cerevisiae* has enabled a more complete fermentation.

Key-words: Selenium, yeast, oxidative stress, fermentation, must, wine.

EXTENDED ABSTRACT

Selenium is an essential trace element that has raised great interest because of its antioxidant and anti-carcinogenic properties. The development of nutritional supplements fortified with selenium is a way to increase intake. Some of these supplements contain inorganic selenium, mainly sodium selenate. There are also some supplements of selenium preparations made from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* enriched with selenium. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has the ability to transform inorganic selenium into organic compounds and, depending on growing conditions, can accumulate high amounts of selenium (up to 3 000 mg kg⁻¹) and turn it into selenomethionine.

This work aimed to study the tolerance of different strains of yeast to selenium and evaluate the possibility of producing selenium-enriched wine yeasts cells.

In this study, tests of cell viability in the presence of increasing concentrations of Se (0 µg mL⁻¹, 5 µg mL⁻¹, 100 µg mL⁻¹) using strains of six different species of yeast, namely, *C. zemplinina* EVN 1154, *H. guilliermondii* EVN 390, *H. uvarum* EVN1117, *L. thermotolerans* EVN 372, *S. cerevisiae* EVN 166 and *T. delbrueckii* EVN 1141 were performed. These trials showed that the most tolerant yeast to selenium levels of 100 µg mL⁻¹ was the *Torulaspora delbrueckii* EVN 1141. The yeast strain *H. uvarum* EVN1117 proved to be the most sensitive to Se.

The determination of protein and antioxidant enzyme activities showed that the response to the toxic effect of selenium varies among species and according to the concentration of selenium applied. Yeasts that showed better response were the *S. cerevisiae* EVN 166 and *H. guilliermondii* EVN 390, for concentrations of 250 µg mL⁻¹ and 100 µg mL⁻¹, respectively.

The fermentations were performed in the grape must from Seara Nova Portuguese variety with the yeast species *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* in two modalities, without selenium and selenium-enriched cells (grown in medium with 5 µg mL⁻¹ selenium).

Fermentations were performed using *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* without selenium and selenium-enriched cells during 25 days. In order to assess the evolution of fermentation, samples were taken after 25 days of fermentation for determination of sugars (g L⁻¹), alcohol by volume (% v / v), pH, total acidity (g tartaric acid L⁻¹) and volatile acidity (acetic acid g dm⁻³).

The fermentations with the yeast *T. delbrueckii* was slower compared to the fermentation using the *S. cerevisiae* yeast. The fermentation with the selenium-enriched cells presented, at the end of fermentation, higher concentration values of sugars and lower alcohol levels compared to the fermentation using yeast cells without selenium, indicating a negative effect of selenium in the fermentation process.

The concentration of total sugars and the levels of ethanol reached at the end fermentation lead to the conclusion that only the yeast *S. cerevisiae* had a more complete fermentation. The fermented with the yeast *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* with and without selenium-enrichment cells is reported to have identical pH and total acidity, which indicated that selenium did not interfered with these parameters. On the contrary, fermentation with selenium-enrichment *T. delbrueckii* increased significantly the volatile acidity of the fermented must.

The fermented must obtained selenium-enriched *S. cerevisiae* yeast reached the highest concentration of selenium, after 25 days of fermentation. Having reached values of selenium of about 84,01 $\mu\text{g L}^{-1}$ which may be related to the fact that the fermentation was more complete, with values of total sugars of 15,75 g L^{-1} while the fermentation with the yeast *T. delbrueckii* showed a total sugar content of 89,31 g L^{-1} at the end of fermentation.

The results are preliminary, but allowed to evaluate the possibility of using selenium-enriched cells to produce wine, and will allow future studies on full-scale vinification processes for potential industrial use.

ÍNDICE GERAL

| | |
|--|------------|
| AGRADECIMENTOS | I |
| RESUMO | II |
| ABSTRACT | III |
| EXTENDED ABSTRACT | IV |
| ÍNDICE DE FIGURAS | IX |
| ÍNDICE DE TABELAS | X |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | XI |
| 1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 2 |
| 2.1. Selénio | 2 |
| 2.2. Suplementação de selénio..... | 3 |
| 2.3. Fermentação alcoólica..... | 4 |
| 2.4. Stresse Oxidativo | 5 |
| 2.4.1. Espécies reactivas de oxigénio (ROS) | 6 |
| 2.4.2. Mecanismos enzimáticos de defesa antioxidantes..... | 7 |
| 2.4.2.1. Ascorbato-peroxidase (APX)..... | 8 |
| 2.4.2.2. Catalase (CAT) | 8 |
| 2.4.2.3. Glutathiona-peroxidase (GPX) | 9 |
| 2.4.2.4. Glutathiona-redutase (GR) | 9 |
| 2.4.2.5. Superóxido-dismutase (SOD) | 10 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 11 |
| 3.1. Espécies de leveduras em estudo | 11 |
| 3.1.1. Manutenção das leveduras | 12 |
| 3.2. Monitorização do crescimento microbiano | 12 |
| 3.2.1. Contagem do número de células viáveis..... | 12 |
| 3.2.2. Contagem do número de células totais | 12 |

| | |
|--|----|
| 3.2.3. Quantificação de biomassa..... | 13 |
| 3.3. Ensaio prévios de tolerância da levedura <i>S. cerevisiae</i> na presença de Se..... | 13 |
| 3.3.1. Ensaio de tolerância da levedura <i>S. cerevisiae</i> na presença de Se durante 24 h..... | 13 |
| 3.3.1.1. Preparação do inóculo | 13 |
| 3.3.1.2. Condições de crescimento..... | 13 |
| 3.3.2. Ensaio de tolerância da levedura <i>S. cerevisiae</i> na presença de Se durante 2 h, 6 h e 24 h | 14 |
| 3.3.2.1. Preparação do inóculo | 14 |
| 3.3.2.2. Condições de crescimento..... | 14 |
| 3.4. Avaliação da tolerância da <i>S. cerevisiae</i> ao Se | 15 |
| 3.4.1. Preparação do inóculo | 15 |
| 3.4.2. Condições de crescimento..... | 15 |
| 3.5. Avaliação da tolerância das diferentes estirpes ao Se | 16 |
| 3.5.1. Preparação do inóculo | 16 |
| 3.5.2. Condições de crescimento..... | 16 |
| 3.6. Determinação da actividade enzimática..... | 17 |
| 3.6.1. Preparação do inóculo | 17 |
| 3.6.2. Condições de crescimento..... | 17 |
| 3.6.3. Preparação dos extractos | 18 |
| 3.6.4. Determinação do teor de proteína solúvel..... | 19 |
| 3.6.5. Determinação da actividade enzimática..... | 19 |
| 3.6.5.1. Ascorbato-peroxidase (APX)..... | 20 |
| 3.6.5.2. Catalase (CAT) | 20 |
| 3.6.5.3. Glutathione-peroxidase (GPX) | 20 |
| 3.6.5.4. Glutathione-redutase (GR)..... | 21 |
| 3.6.5.5. Superóxido-dismutase (SOD) | 21 |
| 3.7. Fermentação | 22 |
| 3.7.1. Preparação do inóculo | 22 |
| 3.7.2. Condições de crescimento..... | 22 |

| | |
|--|-----------|
| 3.7.3. Análise dos parâmetros físico-químicos do mosto fermentado | 25 |
| 3.7.4. Determinação do Se total no mosto fermentado | 25 |
| 3.7.4.1. Amostragem..... | 25 |
| 3.7.4.2. Processo de digestão das amostras | 26 |
| 3.7.4.3. Análise por ICP-MS..... | 26 |
| 3.8. Tratamento estatístico | 26 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 27 |
| 4.1. Ensaio de tolerância da levedura <i>S. cerevisiae</i> na presença de Se durante 24 h | 27 |
| 4.2. Ensaio de tolerância da levedura <i>S. cerevisiae</i> na presença de Se durante 2 h, 6 h e 24 h | 28 |
| 4.3. Avaliação da tolerância da levedura <i>S. cerevisiae</i> ao Se..... | 29 |
| 4.4. Avaliação da tolerância das diferentes estirpes ao selênio | 30 |
| 4.5. Avaliação do efeito do selênio no teor de proteína solúvel | 32 |
| 4.6. Avaliação do efeito do selênio nos mecanismos antioxidantes enzimáticos | 34 |
| 4.6.1. Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 35 |
| 4.6.2. Levedura <i>Hanseniaspora uvarum</i> | 37 |
| 4.6.3. Levedura <i>Torulaspora delbrueckii</i> | 39 |
| 4.6.4. Levedura <i>Lachancea thermotolerans</i> | 40 |
| 4.6.5. Levedura <i>Candida zemplinina</i> | 42 |
| 4.6.6. Levedura <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> | 43 |
| 4.7. Fermentação | 46 |
| 4.7.1. Curvas de fermentação..... | 47 |
| 4.7.2. Análise dos parâmetros físico-químicos do mosto fermentado | 49 |
| 4.7.3. Determinação do Se total no mosto fermentado | 53 |
| 5. CONCLUSÃO | 56 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 58 |
| ANEXO | |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Representação esquemática das principais fontes de ROS e dos principais mecanismos enzimáticos envolvidos na eliminação de ROS | 7 |
| Figura 2 - Representação esquemática do ensaio de fermentação com levedura <i>S. cerevisiae</i> EVN 166..... | 24 |
| Figura 3 - Representação esquemática da recolha das amostras. | 25 |
| Figura 4 – Curvas de crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> EVN 166 para diferentes concentrações de Se ($0 \mu\text{g mL}^{-1}$, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $250 \mu\text{g mL}^{-1}$)..... | 29 |
| Figura 5 – Curvas de crescimento das seis estirpes de leveduras para diferentes concentrações de Se (A) $0 \mu\text{g mL}^{-1}$, (B) $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e (C) $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ | 31 |
| Figura 6 – Teor de proteína solúvel das espécies de leveduras estudadas pela exposição aos diferentes níveis de selénio testados. (a) <i>S. cerevisiae</i> , (b) <i>H. uvarum</i> , (c) <i>T. delbrueckii</i> , (d) <i>C. zemplinina</i> , (e) <i>L. thermotolerans</i> , (f) <i>H. guilliermondii</i> | 33 |
| Figura 7 – Actividade enzimática da (a) APX, (b) CAT, (c) GPX, (d) GR, (e) SOD na levedura <i>S. cerevisiae</i> EVN 166 | 36 |
| Figura 8 – Actividade enzimática da (a) APX, (b) CAT, (c) GPX, (d) GR na levedura <i>H. uvarum</i> EVN 1117 | 38 |
| Figura 9 – Actividade enzimática da (a) CAT, (b) GPX, (c) GR, na levedura <i>T. delbrueckii</i> EVN 1141..... | 39 |
| Figura 10 – Actividade enzimática da (a) APX, (b) CAT, (c) GPX, (d) GR, (e) SOD na levedura <i>L. thermotolerans</i> EVN 372..... | 41 |
| Figura 11 – Actividade enzimática da (a) CAT, (b) GPX, (c) GR, (d) SOD na levedura <i>C. zemplinina</i> EVN 1154 | 42 |
| Figura 12 – Actividade enzimática da (a) APX, (b) CAT, (c) GPX, (d) GR, (e) SOD na levedura <i>H. guilliermondii</i> EVN 390 | 45 |
| Figura 13 – Curvas de fermentação do mosto com a levedura (A) <i>S. cerevisiae</i> EVN 166 e (B) <i>T. delbrueckii</i> EVN 1141 sem selénio e pré-enriquecidas em Se. | 48 |
| Figura 14 – (a) Teor alcoólico volúmico (% v/v) e o (b) Concentração de açúcares (g L^{-1}) no mosto fermentado com as leveduras <i>S. cerevisiae</i> EVN 166 e <i>T. delbrueckii</i> EVN 1141 sem selénio (Sc 0 e Td 0) e pré-enriquecidas em selénio (Sc 5 e Td 5) após 25 dias de fermentação | 50 |
| Figura 15 – (a) pH; (b) acidez total ($\text{g ác. tart. L}^{-1}$) e (c) acidez volátil ($\text{g ác. acético L}^{-1}$) no mosto fermentado com as leveduras <i>S. cerevisiae</i> EVN 166 e <i>T. delbrueckii</i> EVN 1141 sem | |

selênio (Sc 0 e Td 0) e pré-enriquecidas em selênio (Sc 5 e Td 5) após 25 dias de fermentação52

Figura 16 – Concentração de selênio ($\mu\text{g L}^{-1}$) no mosto sem inoculação e no mosto fermentado com as leveduras *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii* pré-enriquecidas em selênio ...54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Leveduras em estudo11

Tabela 2 – Quantidade de Na_2SeO_3 adicionado a 20 mL de meio YEPD14

Tabela 3 – Quantidade de Na_2SeO_3 adicionado a 20 mL de meio YEPD15

Tabela 4 – Quantidade de Na_2SeO_3 adicionado a 300 mL de meio YEPD16

Tabela 5 – Quantidade de Na_2SeO_3 adicionado a 300 mL de meio YEPD17

Tabela 6 – Quantidade de Na_2SeO_3 adicionado a 300 mL de meio YEPD18

Tabela 7 – Número de células viáveis no meio de cultura27

Tabela 8 – Número de células viáveis no meio de cultura28

Tabela 9 – Número de células viáveis no inóculo30

Tabela 10 – Número de células viáveis no mosto após inoculação47

LISTA DE ABREVIATURAS

[Se] – Concentração de selénio

APX – Ascorbato-peroxidase

CAT – Catalase

D.O. 640 nm – Densidade óptica medida a $\lambda = 640$ nm

DDR – Dose diária recomendada

FTIR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

GPX – Glutathione-peroxidase

GR – Glutathione-redutase

ICP-MS – Espectrofotometria de massa acoplado a plasma indutivo

O/N – *Overnight*

p/v – Peso por volume

ROS – Espécies reactivas de oxigénio

Sc – *Saccharomyces cerevisiae*

SOD – Superóxido-dismutase

Td – *Torulaspora delbrueckii*

Tris-HCl - Tris-(hidroximetil)-aminometano

UFC – Unidades formadoras de colónias

v/v – Volume/volume

YEPD – Meio extracto de levedura, peptona e dextrose

ϵ – Coeficiente de absorvidade molar

1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

Num Mundo moderno onde os hábitos alimentares se baseiam em alimentos nutricionalmente pobres, um número crescente de pessoas procura o uso de suplementos, com o objectivo de evitar determinadas carências nutricionais. Ao mesmo tempo cresce a oferta da indústria, com um número cada vez maior de diferentes suplementos nutricionais (Fernandes, 2008).

Segundo Pérez-Corona *et al.* (2011), o selénio (Se) na forma de selenoaminoácidos e selenoproteínas desempenha um papel importante no sistema imunológico, reduz a presença de radicais livres produzidos pelo metabolismo do oxigénio contribuindo para a diminuição do desenvolvimento de doenças crónicas, como cancro e doenças cardíacas. Na última década os suplementos à base de selénio têm vindo a crescer no mercado podendo ser distinguidos dois tipos de suplementos à base de selénio, os multivitamínicos e multiminerais contendo selénio inorgânico e os suplementos com levedura *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida com selénio. Apesar de alguma utilização da suplementação de levedura enriquecida com selénio, o efeito do selénio sobre as leveduras ainda não foi estudado com profundidade.

Em 2010 foram iniciados trabalhos no INIA – Dois Portos, com o objectivo de estudar a influência do selénio no crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Foram realizados ensaios prévios em meio de cultura líquido e sólido com diferentes concentrações de Se, com vista à determinação do nível máximo de tolerância em diferentes estirpes de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Foi realizado igualmente um ensaio de fermentação em mosto adicionado de Se e foi avaliada a eficiência de fermentação com a estirpe de *S. cerevisiae* EVN 166.

O presente trabalho pretende dar continuidade a este estudo, tendo como objectivo último avaliar em escala laboratorial a possibilidade de produzir vinho branco com leveduras pré-enriquecidas em selénio. Será avaliada a tolerância ao selénio de seis estirpes de leveduras de fermentação e o efeito tóxico do selénio ao nível do teor de proteína solúvel e na actividade enzimática das enzimas ascorbato-peroxidase, catalase, glutathione-peroxidase, glutathione-redutase, superóxido-dismutase, de modo a avaliar a possível existência de mecanismos antioxidantes específicos nas seis estirpes de leveduras. Posteriormente será avaliado o comportamento de leveduras pré-enriquecidas em selénio na fermentação de mosto de uva, e determinada a quantidade de selénio no mosto no final de fermentação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Selénio

O selénio é um mineral que desempenha funções antioxidantes, sendo um nutriente essencial para os animais e seres humanos. Pode encontrar-se em quatro estados de oxidação, tais como selénio elementar (Se^0), seleneto (Se^{2-}), selenito ($\text{Se}^{(+4)}\text{O}_3^{2-}$) e selenato ($\text{Se}^{(+6)}\text{O}_3^{2-}$) e em duas formas químicas, sais minerais inorgânicos (selenito de sódio, selenato) e orgânicos (selenometionina, selenocisteína) (Stolz *et al.*, 2006).

A selenocisteína tem uma estrutura semelhante à cisteína, com um átomo de selénio no lugar do enxofre. As proteínas que incluem selenocisteína são designadas por selenoproteínas, tais como glutathione-peroxidase (GPX), iodotironina desiodinases, tioredoxina reductase, selenoproteína P, selenoproteína W, entre outras (Pedrero e Madrid, 2009).

O selénio encontra-se habitualmente associado aos aminoácidos metionina e cisteína, nos alimentos de origem animal (peixe, ovos) e também nos cereais, leguminosas e frutos gordos (Afonso e Vaz de Almeida, 2001). A forma química em que o selénio está presente nos alimentos afecta a sua biodisponibilidade. Em geral, as formas orgânicas são mais biodisponíveis e menos tóxicas do que as formas inorgânicas. A selenometionina é uma das espécies de selénio mais biodisponível, permitindo maior absorção de Se nos organismos do Homem e dos animais (Tinggi, 2003). A comparação com o efeito de suplementos nutricionais em algumas regiões da China, caracterizada pelos baixos níveis de selénio na alimentação, mostrou que a biodisponibilidade de selenometionina foi duas vezes maior do que o selénio inorgânico, o selenito (Pedrero e Madrid, 2009).

Em várias regiões do Mundo o teor de selénio na dieta foi estimado como sendo insuficiente para a correcta actividade de protecção das selenoenzimas. Os primeiros relatos de doenças devido à deficiência de selénio na população humana ocorreram na China (Tinggi, 2003). A deficiência em selénio diminui a quantidade de selenoproteínas, alterando os processos biológicos mediados pelas selenoproteínas e impede a síntese e a função da GPX. Os efeitos da deficiência de selénio são geralmente a cardiomiopatia reversível, conhecida como a doença de Keshan, infertilidade e artrite (Pedrero e Madrid, 2009).

A dose diária recomendada (DDR) de selénio para homens e mulheres é cerca de 55 µg/dia, muito embora este valor dependa do país, região, idade e sexo dos indivíduos (Pedrero e Madrid, 2009). O nível máximo de ingestão de selénio é cerca de 400 µg/dia. A ingestão elevada de selénio pode causar toxicidade provocando uma selenose (anormalidades neurológicas, mancha esbranquiçada nas unhas) (National Academy of Sciences, 2000).

O selênio pode ter um efeito antioxidante e pro-oxidante quando em excesso, dependendo da espécie, do estado de oxidação e da concentração. Os efeitos benéficos parecem estar associados à redução dos danos oxidativos causados pela excessiva quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Berger, 2005; Pedrero e Madrid, 2009). O selênio na forma de selenocisteína (constituente do centro activo da enzima glutationa-peroxidase que é responsável pela remoção do peróxido de hidrogénio) desempenha um papel importante no sistema imunológico, reduzindo a presença de ROS contribuindo para a diminuição do desenvolvimento de doenças crónicas, como o cancro, e doenças cardíacas. A toxicidade do selênio pode levar à formação de ROS, espécies estas que podem induzir à oxidação do DNA, à quebra da sua cadeia dupla e a morte celular (Pérez-Corona *et al.*, 2011; Navarro-Alarcon e Cabrera-Vique, 2008).

2.2. Suplementação de selénio

Hoje em dia com o conhecimento das propriedades antioxidantes do selênio e preventivas contra o cancro, há um grande interesse em desenvolver suplementos nutricionais enriquecidos com selênio que são uma alternativa para aumentar a sua ingestão (Navarro-Alarcon e Cabrera-Vique, 2008; Ponce de León *et al.*, 2002). Alguns destes suplementos contêm selênio inorgânico, principalmente selenito de sódio. Existem também alguns suplementos de selênio preparados à base de levedura *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida com selênio (Navarro-Alarcon e Cabrera-Vique, 2008).

A levedura *S. cerevisiae* tem a capacidade de transformar o selênio inorgânico em compostos orgânicos e, dependendo das condições de crescimento, pode acumular elevadas quantidades de selênio (até 3 000 mg kg⁻¹) e transformá-lo em selenometionina (Pedrero e Madrid, 2009; Pérez-Corona *et al.*, 2011).

A aplicação de levedura enriquecida com selênio não é restrita apenas a produtos farmacêuticos. Na região norte da Ucrânia, utiliza-se como fermento para a elaboração de pão, sendo uma alternativa para aumentar a ingestão de selênio pela população. O teor de selênio neste pão é equivalente a 25 % do DDR e é encontrado principalmente na forma de selenometionina (Stabnikova *et al.*, 2008; Pedrero e Madrid, 2009). Na alimentação de borregos e vitelos também têm sido adicionados com sucesso suplementos à base de levedura enriquecida com selênio (Juniper *et al.*, 2009 e Fokkink *et al.*, 2009).

Vários autores têm descrito a preparação de alimentos enriquecidos com selênio mediado por um processo de fermentação, como é o caso de produtos lácteos (Alzate *et al.*, 2008). A partir desta abordagem Pérez-Corona *et al.* (2011) avaliaram em escala laboratorial pela primeira vez a transformação do selenito pelas leveduras da espécie *S. cerevisiae* e

S. bayanus durante a produção de vinho branco. Concluíram que a produção de vinho branco por fermentação alcoólica é compatível com a presença de selénio inorgânico e independente da espécie utilizada, e que o vinho com selénio pode ser uma fonte adequada de selenometionina.

2.3. Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é um processo que envolve a transformação de açúcares em etanol e dióxido de carbono (CO₂) e outros metabolitos secundários. Geralmente, no início das fermentações espontâneas do mosto de uva, predominam as leveduras não-*Saccharomyces*, como *Hanseniaspora* (anamorfo *Kloeckera*), *Candida* e *Metschnikowia*, sendo, algumas vezes, acompanhadas pelo crescimento de leveduras das espécies *Pichia*, *Issatchenkia* e *Kluyveromyces*. No início do processo fermentativo estas leveduras encontram-se em maior quantidade promovendo o arranque da fermentação, multiplicando-se até 10⁶-10⁷ unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC mL⁻¹) mas após dois ou três dias de fermentação começam a morrer, altura em que a espécie *Saccharomyces cerevisiae* se torna predominante (10⁷-10⁸ UFC mL⁻¹) e continua a fermentação alcoólica até ao fim (Fleet, 2003; Zott *et al.*, 2008; Ramos, 2007).

O desaparecimento precoce das leveduras não-*Saccharomyces* durante a fermentação está geralmente associado à sua incapacidade de sobreviver a concentrações elevadas de etanol, com valores de tolerância de aproximadamente 6 % (v/v) de etanol (Pina *et al.*, 2004; Ciani *et al.*, 2006), assim como à sua incapacidade de resistência às condições progressivamente adversas resultantes da evolução do processo fermentativo, tais como limitações nutricionais, escassez de oxigénio, baixos valores de pH e outros compostos tóxicos (por exemplo ácidos orgânicos) (Fleet, 2003). A pressão selectiva exercida por estes factores ambientais bem como por certas interações que podem ocorrer entre leveduras (por exemplo factor *Killer*) explicam a existência de apenas algumas estirpes de *S. cerevisiae* no final do processo fermentativo (Martini, 2003; Ciani *et al.*, 2004; Francisco, 2008).

Durante a fermentação alcoólica, as leveduras convertem os açúcares fermentescíveis em etanol, produzindo também um elevado número de compostos voláteis embora em baixa quantidade, tais como álcoois superiores (álcool isoamílico ou 3-metil-1-butanol, n-propanol, 2-feniletanol), aldeídos, ésteres e acetatos, que podem ser bastante importantes na medida em que são compostos químicos responsáveis pelo aroma e que poderão influenciar as propriedades organolépticas do vinho (Ward, 1991). De acordo com Baleiras Couto *et al.* (2005), as leveduras não-*Saccharomyces* contribuem para as características sensoriais do produto final, pois estas leveduras são grandes produtoras de compostos secundários, cuja produção vai depender das espécies existentes.

As fermentações espontâneas podem produzir vinhos de excelente qualidade, mas devido a variações na biodiversidade da microflora de um ano para o outro, este processo torna-se por vezes pouco eficaz traduzindo-se na dificuldade de produzir vinhos com as características desejadas. Por esta razão a enologia moderna recorre ao uso de leveduras “starter” que são estirpes seleccionadas de variadas regiões com tradição vitivinícola, frequentemente estirpes da espécie *S. cerevisiae*. A estirpe inoculada predomina e reprime a flora indígena, permitindo um melhor controlo da microbiologia do processo, e consequentemente uma fermentação rápida e previsível, que se traduz na qualidade reprodutível do produto final, o vinho (Casal *et al.*, 2004).

2.4. Stresse Oxidativo

Como um organismo vivo as leveduras são expostas a diversas situações desfavoráveis, que se traduzem por desequilíbrios ou stresse, ao nível do seu desenvolvimento e crescimento. Neste contexto, o stresse representa uma alteração significativa das condições favoráveis ao crescimento e desenvolvimento normal de um organismo, o que origina uma resposta, a diferentes níveis, que passam por alterações fisiológicas, bioquímicas, moleculares e ainda na expressão de genes (Buchanan *et al.*, 2000).

O stresse oxidativo é uma das primeiras respostas das interações incompatíveis entre os agentes bióticos (causado por outros seres vivos) e os abióticos (como os metais pesados) e os organismos vivos, e resulta do aumento da produção intracelular de ROS. Este aumento desencadeia nas leveduras uma resposta metabólica que se traduz na activação de mecanismos específicos de eliminação do excesso de ROS no interior das células de forma a obter um controle da sua acumulação, bem como a regulação da expressão genética para produção de metabolitos de sinalização (peróxido de hidrogénio, glutathiona reduzida e oxidada, ascorbato e desidroascorbato) (Jamieson, 1998).

Elementos como o selénio, quando presentes em quantidades excessivas, podem provocar stresse oxidativo, que se deve à ocorrência na célula de reacções redox descontroladas que resultam na formação de ROS e peroxidação dos lípidos. Contudo o selénio em quantidades normais é um antioxidante envolvido na defesa dos tecidos contra o stresse oxidativo, na regulação do estado redox de inúmeras moléculas (Brenneisen *et al.*, 2005).

2.4.1. Espécies reactivas de oxigénio (ROS)

As espécies reactivas de oxigénio são entidades (moléculas, iões, radicais) que contêm oxigénio e são muito reactivas, provocando reacções de oxidação de outros componentes celulares.

As ROS formam-se por reacções sequenciais a partir do oxigénio no estado estacionário, quer por excitação, por inversão do spin de um electrão (singleto de oxigénio: $^1\text{O}_2$) ou por transferência de 1, 2 ou 3 electrões formando, sucessivamente, anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) (Martins e Mourato, 2010; Mithöfer, 2004).

As principais espécies reactivas derivadas do oxigénio incluem: o singleto oxigénio ($^1\text{O}_2$), o anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$).

O singleto oxigénio ($^1\text{O}_2$) é a forma mais reactiva do oxigénio formado pelo movimento de um dos electrões desemparelhados, por inversão de spin (Dickinson e Schweizer, 2004).

O anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) é moderadamente reactivo, sendo formado através de uma grande variedade de processos que ocorrem em condições aeróbias. Embora o ($\text{O}_2^{\bullet-}$) tenha uma reactividade limitada em soluções aquosas é muito importante que a sua eliminação seja rápida e eficiente, uma vez que este radical pode dar origem a mais espécies de oxigénio também prejudiciais à célula (Gille e Sigler, 1995).

O peróxido de hidrogénio (H_2O_2) é uma molécula de semi-vida relativamente longa, com capacidade de atravessar as membranas biológicas, causando, deste modo, danos às células, induzindo a formação de radicais (Moller *et al.*, 2007). O peróxido de hidrogénio também é relativamente inerte, mas tem efeitos nocivos principalmente através da sua conversão para o radical hidroxilo livre através da reacção de Fenton. A molécula de peróxido de hidrogénio pode servir como agente de oxidação e de redução, e a sua reactividade é fortemente limitada em soluções aquosas. O H_2O_2 pode inactivar algumas enzimas tais como a gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase, oxidando também alguns ácidos, como o piruvato (Gille e Sigler, 1995).

O radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) com uma semi-vida curta tem um grande potencial oxidativo, sendo considerado muito reactivo. Embora tenha semi-vida curta é particularmente difícil de eliminar dado que não são conhecidas moléculas específicas que consiga degradar, pelo que é mais vantajoso para a célula eliminar os seus precursores, como o superóxido (Martins e Mourato, 2008).

O efeito nocivo de ROS é muito variável, dependendo da quantidade gerada de cada espécie, da sua reactividade e das moléculas em que actuam, do tempo de semi-vida, da distância que podem percorrer na célula e do compartimento celular em que são produzidos

em maior quantidade. Nas células os efeitos nocivos das ROS resultam de danos oxidativos em constituintes celulares como aminoácidos, proteínas, glúcidos, lípidos e ácidos nucleicos (Martins e Mourato, 2008). Torna-se evidente a importância de uma regulação na produção e na remoção das ROS em cada compartimento celular, como sendo fundamental para o equilíbrio celular e prevenção de danos que estes podem causar.

2.4.2. Mecanismos enzimáticos de defesa antioxidantes

Todos os organismos aeróbios contêm uma grande diversidade de defesas antioxidantes, que são organizados para agir em três níveis: a intercepção, a prevenção e a reparação (Vieira da Costa, 1998).

Os mecanismos antioxidantes incluem sistemas enzimáticos capazes de remover, neutralizar e/ou eliminar radicais livres (Baptista, 2009). Entre os principais mecanismos antioxidantes enzimáticos, destaca-se a importância da catalase (CAT), superóxido-dismutase (SOD), ascorbato-peroxidase (APX), glutatona-peroxidase (GPX) e glutatona-redutase (GR). Os principais mecanismos enzimáticos envolvidos na eliminação de ROS nas leveduras encontram-se representados na figura 1.

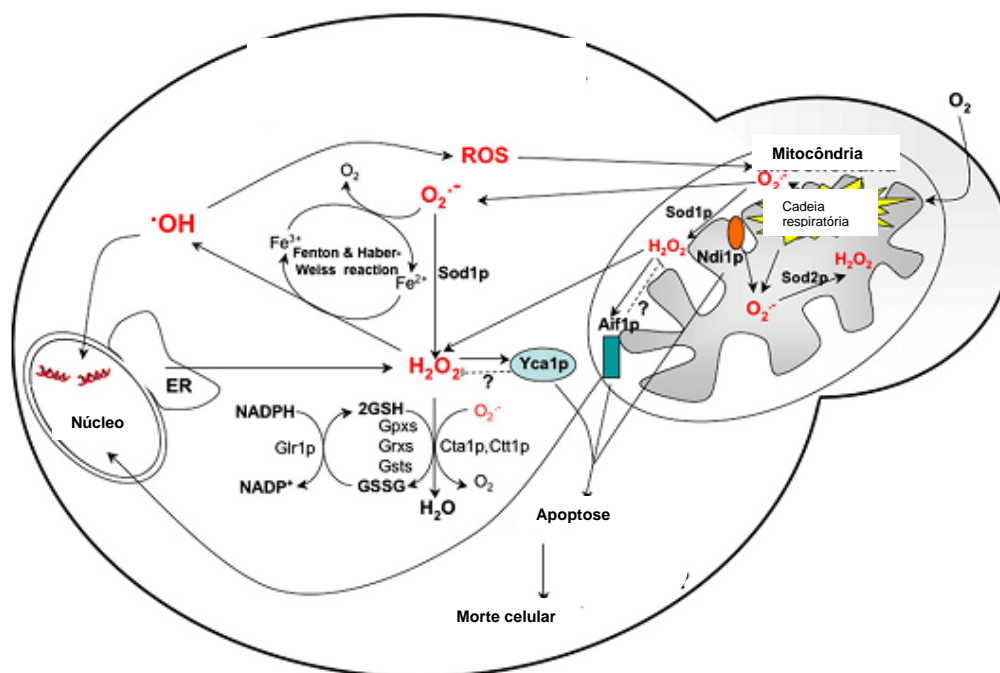
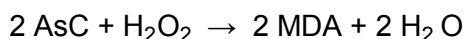


Figura 1 – Representação esquemática das principais fontes de ROS e dos principais mecanismos enzimáticos envolvidos na eliminação de ROS (Adaptado de Perrone *et al.*, 2008).

2.4.2.1. Ascorbato-peroxidase (APX)

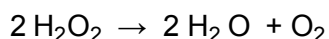
A APX é uma oxidorreductase, caracteriza-se por possuir uma elevada especificidade para o ascorbato sendo a enzima responsável pela eliminação do poder tóxico do H_2O_2 nas células. Esta enzima utiliza duas moléculas de ascorbato (AsC) para reduzir o H_2O_2 a H_2O , com a produção de duas moléculas de monodesidroascorbato (MDA) e de H_2O (Mittler e Zilinskas, 2001; Apel e Hirt, 2004) de acordo com o seguinte esquema reaccional:



O MDA poder ser regenerado pela MDA-redutase, que utiliza NADP(H) como poder redutor. Pode ser dismutado espontaneamente, originando desidroascorbato. A regeneração do ascorbato é mediada pela desidroascorbato-redutase (DHAR), que é conduzida pela oxidação da glutatona (Apel e Hirt, 2004).

2.4.2.2. Catalase (CAT)

A catalase é uma enzima essencial na decomposição do H_2O_2 , utilizando uma reacção catalítica na qual o H_2O_2 actua como aceitador e dador de moléculas de hidrogénio (Scandalios, 2005), de acordo com o seguinte esquema reaccional:

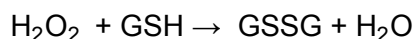


As leveduras têm duas catalases, a catalase A codificada pelo gene CTA1 que se localiza no peroxissoma e a catalase T codificada pelo gene CTT1 que se encontra no citoplasma (Santoro e Thiele, 1997; Jamieson, 1998; Hohmann e Mager, 2003). Entre as enzimas que degradam o H_2O_2 , a CAT é a única que consegue catalisar este substrato sem consumir equivalentes constituindo, assim, um mecanismo eficiente de remoção de H_2O_2 (Scandalios, 2005).

2.4.2.3. Glutathione-peroxidase (GPX)

Esta enzima caracteriza-se por ser uma proteína tetramérica com quatro átomos de selénio por molécula e pertencente à família das selenoenzimas (Tinggi, 2003).

Além disso, actua como catalisador na redução do peróxido de hidrogénio pela oxidação da glutathione reduzida (GSH) e formação de glutathione oxidada (GSSG) (Apel e Hirt, 2004), de acordo com o seguinte esquema reaccional:

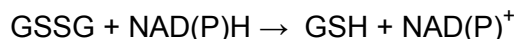


Estas funções ajudam a manter a integridade da membrana e a reduzir a probabilidade de propagação de danos oxidativos em biomoléculas como lípidos, lipoproteínas e DNA (Pedrero e Madrid, 2009).

2.4.2.4. Glutathione-reductase (GR)

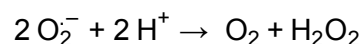
A glutathione é um composto que tem como função a protecção das células contra radicais livres oxidantes devido a ter na sua composição um grupo tiol. A glutathione pode ser encontrada nos microrganismos, plantas e animais sendo responsável pela captura dos radicais de oxigénio e actuando de forma a manter o equilíbrio redox nas células de levedura (Walker, 2009; Pinheiro, 2004).

A enzima glutathione-reductase é a principal responsável pela redução da glutathione oxidada (GSSG) a glutathione reduzida (GSH) (Jamieson, 1998). A glutathione-reductase protege as células do stresse oxidativo através da redução rápida da glutathione oxidada (Becker *et al.*, 1996). A reacção catalisada pela GR encontra-se representada pelo seguinte esquema reaccional (Apel e Hirt, 2004):



2.4.2.5. Superóxido-dismutase (SOD)

O superóxido-dismutase tem uma função essencial na protecção das células contra as espécies reactivas do oxigénio, pois converte o radical superóxido em peróxido de hidrogénio (Scandalios, 2005), de acordo com o seguinte esquema reaccional:



As células de levedura contêm dois genes SOD, o gene SOD1 que codifica o superóxido-dismutase de cobre-zinco (Cu/ZnSOD) que aparece no citoplasma de quase todos os eucariotas e o gene SOD2 que codifica o superóxido-dismutase de manganésio (MnSOD) que se encontra nas mitocôndrias dos eucariotas (Longo *et al.*, 1996). O MnSOD tem como tarefa a protecção da mitocôndria durante o crescimento aeróbio, através da eliminação do radical superóxido, enquanto que, o Cu/ZnSOD tem como função a eliminação dos radicais superóxido do citoplasma celular (Walker, 1998; Pinheiro, 2004). A localização distinta destas enzimas é determinante na sua função de protecção contra o stresse oxidativo (Pinheiro, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Espécies de leveduras em estudo

Neste trabalho usaram-se cinco espécies de leveduras não-*Saccharomyces* e uma levedura da espécie *S. cerevisiae*, pertencentes à Colecção de Microrganismos do INRB, INIA – Dois Portos (Colecção EVN). As estirpes de leveduras encontram-se conservadas em meio YM (extracto de levedura 0,3 %, extracto de malte 0,3 %, bactopectona 0,5 % e água ultrapura) com 10 % de glicerol numa câmara congeladora (Nuair, Ultralow Freezer) à temperatura de – 80 °C. Na tabela 1 estão referenciadas as estirpes utilizadas.

Tabela 1 – Leveduras em estudo.

| Espécie | EVN ¹⁾ (N.º) | Outras ¹⁾ colecções | Origem do isolamento |
|--|----------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| <i>Candida zemplinina</i> | 1154 | ML 66/2002 | Mosto |
| <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> ^T | 390 | CBS 2591 | Filo-traqueia de abelha |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i> | 1117 | ML 10/2002 | Mosto |
| <i>Lachancea thermotolerans</i> ^T | 372 | CBS 6340 PYCC 4135 | Conserva de ameixa mirabelle |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 166 | IGC 5466 | Levedura enológica comercial |
| <i>Torulaspora delbrueckii</i> | 1141 | ML 97/2002 | Mosto |

T, estirpe tipo;

- 1) EVN, Colecção de Microrganismos do INIA – Dois Portos; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft, Holanda; ML, Musee de Lectoure, França; PYCC, Portuguese Yeast Culture Collection, Universidade Nova de Lisboa; IGC, Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras.

3.1.1. Manutenção das leveduras

A reactivação das células foi feita em placas de Petri com meio YEPD sólido com a seguinte composição: extracto de levedura 0,5 % (p/v); peptona 1,0 % (p/v); glucose 2,0 % (p/v); agar 2,0 % (p/v). As colónias obtidas após incubação em estufa (WTB binder Oven) a 26 °C, durante 48 h, foram utilizadas para repicar tubos com meio YEPD sólido inclinado. Os tubos com as culturas foram mantidos à temperatura ambiente.

Em cada ensaio, de forma a obter uma cultura fresca e/ou obter suficiente biomassa para os inóculos repicou-se uma ansada para placas com meio YEPD sólido que foram incubadas a 26 °C, durante 48 h.

3.2. Monitorização do crescimento microbiano

3.2.1. Contagem do número de células viáveis

O número de células viáveis de uma suspensão de células de levedura foi calculado de acordo com a ISO 7218:1985. Procedeu-se ao espalhamento de 100 µL de suspensão de células em placas de meio YEPD sólido e incubação a 25 °C, durante 72 h. Após este período contou-se o número de colónias por placa. Sempre que necessário foram efectuadas diluições, de forma a garantir que o número de colónias se situasse entre as 10 – 300 colónias por placa. Foi realizado este procedimento em todos os momentos em que se procedeu à contagem do número de células viáveis.

3.2.2. Contagem do número de células totais

A contagem do número de células totais de uma suspensão de células de levedura foi feita de acordo com a ISO 7218:1985. É utilizado uma gota da suspensão de células de levedura, que se coloca na superfície da câmara de Neubauer e procede-se à contagem do número de células totais através do microscópio. A contagem foi feita no campo A e B em 5 dos 25 quadrados constituintes de cada campo, de acordo com o descrito na norma ISO.

Sempre que necessário foram efectuadas diluições de forma a garantir que o somatório do número de células do campo A e B se situasse entre 200 – 500 células de levedura. Executou-se este procedimento em todos os momentos em que se procedeu à contagem do número de células totais.

3.2.3. Quantificação de biomassa

O acompanhamento do crescimento celular realizou-se através da leitura da densidade óptica das culturas, a 640 nm (D.O. 640 nm), utilizando-se um espectrofotómetro (Varian Cary 100 Bio UV – VIS Spectrophotometer). As amostras foram retiradas em intervalos de tempo adequados e diluídas com água destilada sempre que a D.O. 640 nm excedeu o valor de 0,60, de forma a assegurar a proporcionalidade entre a D.O. 640 nm e a biomassa presente.

3.3. Ensaios prévios de tolerância da levedura *S. cerevisiae* na presença de Se

Numa primeira fase, realizaram-se dois ensaios prévios com vista à determinação do teor máximo de selénio (Se) tolerado pela levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Estes ensaios foram realizados com a levedura *S. cerevisiae* EVN 166 e foram ensaiados diferentes tempos de amostragem. A informação obtida nestes ensaios prévios permitiu delinear o ensaio experimental completo.

3.3.1. Ensaio de tolerância da levedura *S. cerevisiae* na presença de Se durante 24 h

Este ensaio consistiu na avaliação do número de células viáveis após 24 h de crescimento da levedura *S. cerevisiae* EVN 166 em meio YEPD líquido com diferentes concentrações de selénio ($0 \mu\text{g mL}^{-1}$; $5,6 \mu\text{g mL}^{-1}$; $34,8 \mu\text{g mL}^{-1}$; $49,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $94,0 \mu\text{g mL}^{-1}$).

3.3.1.1. Preparação do inóculo

A preparação do inóculo foi realizada por transferência de uma ansada de biomassa fresca (proveniente da placa com meio YEPD sólido), para um balão de Erlenmeyer de 100 mL, contendo 20 mL de meio YEPD líquido. As culturas foram incubadas, com agitação orbital (Fitoclima 750 E, Aralab), a 120 rpm, a 25 °C, *overnight* (O/N), de modo a obter células em fase exponencial. No momento da adição do inóculo, foi feita a contagem do número de células totais em hemocitómetro. Foi usado um inóculo de 10 % (v/v).

3.3.1.2. Condições de crescimento

Ao meio de cultura base (YEPD) foram adicionadas diferentes quantidades de selenito de sódio (Na_2SeO_3) conforme referido na tabela 2, obtendo-se concentrações finais de $0 \mu\text{g mL}^{-1}$; $5,6 \mu\text{g mL}^{-1}$; $34,8 \mu\text{g mL}^{-1}$; $49,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $94,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. O crescimento das células decorreu em balões de Erlenmeyer de 100 mL, usando um volume total de 20 mL e 10 % (v/v) de inóculo, durante 24 h em agitação orbital a 120 rpm, a 25 °C.

Ao fim de 24 h, centrifugou-se a totalidade do volume durante 5 minutos, 3 500 rpm, 7 °C (Heraeus Biofuge Stratos) e eliminou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o sedimento em 5 mL de solução de triptona sal (ver em Anexo I) e foi feita a contagem do número de células viáveis presentes nesta suspensão de células, através do plaqueamento de 100 µL da suspensão ou de diluição adequada, como referido em 3.2.1..

Tabela 2 – Quantidade de Na₂SeO₃ adicionado a 20 mL de meio YEPD.

| [Se] (µg mL ⁻¹) | Na ₂ SeO ₃ (mg) |
|-----------------------------|---------------------------------------|
| 0,0 | ----- |
| 5,6 | 0,112 |
| 34,8 | 0,696 |
| 49,7 | 0,994 |
| 94,0 | 1,880 |

3.3.2. Ensaio de tolerância da levedura *S. cerevisiae* na presença de Se durante 2 h, 6 h e 24 h

Este ensaio preliminar consistiu na avaliação do número de células viáveis após 2 h, 6 h e 24 h de crescimento da levedura *S. cerevisiae* EVN 166 em meio YEPD líquido com diferentes concentrações de selénio (0 µg mL⁻¹; 500 µg mL⁻¹; 5 000 µg mL⁻¹ e 25 000 µg mL⁻¹).

3.3.2.1. Preparação do inóculo

A preparação do inóculo foi realizada por transferência de uma ansada de biomassa fresca (proveniente da placa com meio YEPD sólido), para um balão de Erlenmeyer de 100 mL, contendo 20 mL de meio YEPD líquido. As culturas foram incubadas, com agitação orbital (Fitoclima 750 E, Aralab), a 120 rpm, a 25 °C, O/N, de modo a obter células em fase exponencial. No momento da adição do inóculo, foi feita a contagem do número de células totais em hemocitómetro. Foi usado um inóculo de 2 % (v/v).

3.3.2.2. Condições de crescimento

Ao meio de cultura base (YEPD) foram adicionadas diferentes quantidades de Na₂SeO₃ conforme referido na tabela 3, obtendo-se concentrações finais de 0 µg mL⁻¹; 500 µg mL⁻¹; 5 000 µg mL⁻¹ e 25 000 µg mL⁻¹. O crescimento das células decorreu em balões de

Erlenmeyer de 100 mL, usando um volume total de 20 mL e 2 % (v/v) de inóculo, durante 24 h em agitação orbital a 120 rpm, a 25 °C.

Ao fim de 2 h, retirou-se uma amostra de 5 mL e centrifugou-se durante 5 minutos, 3 500 rpm, 7 °C e eliminou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o sedimento em 5 mL de solução de triptona sal e foi feita a contagem do número de células viáveis presentes nesta suspensão de células, através do plaqueamento de 100 µL da suspensão ou de diluição adequada, como referido em 3.2.1.. Repetiu-se o mesmo procedimento às 6 h e às 24 h.

Tabela 3 – Quantidade de Na₂SeO₃ adicionado a 20 mL de meio YEPD.

| [Se] (µg mL ⁻¹) | Na ₂ SeO ₃ (g) |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| 0 | ----- |
| 500 | 0,0100 |
| 5 000 | 0,1002 |
| 25 000 | 0,4998 |

3.4. Avaliação da tolerância da *S. cerevisiae* ao Se

Este ensaio consistiu na avaliação da perda de viabilidade celular da levedura *S. cerevisiae* EVN 166 em meio YEPD líquido com diferentes concentrações de selénio (0 µg mL⁻¹; 5 µg mL⁻¹ e 250 µg mL⁻¹).

3.4.1. Preparação do inóculo

A preparação do inóculo, foi realizada por transferência de uma ansada de biomassa fresca (proveniente da placa com meio YEPD sólido), para um balão de Erlenmeyer de 100 mL, contendo 20 mL de meio YEPD. As culturas foram incubadas, com agitação orbital (Fitoclima 750 E, Aralab), a 120 rpm, a 25 °C, O/N. No momento da adição do inóculo, foi feita a contagem do número de células viáveis em hemocitómetro. Foi usado um inóculo de 2 % (v/v).

3.4.2. Condições de crescimento

Ao meio de cultura YEPD líquido foram adicionadas diferentes quantidades de Na₂SeO₃ conforme referido na tabela 4, obtendo-se concentrações finais de 0 µg mL⁻¹; 5 µg mL⁻¹ e 250 µg mL⁻¹. Este meio foi preparado num único frasco com um volume de 300 mL e posteriormente foi transferido para frascos de 100 mL onde foi feita a inoculação num

volume total de 100 mL e 2 % (v/v) de inóculo. De cada concentração ensaiada foram feitos duplicados.

Após inoculação o meio foi dividido por dois balões de Erlenmeyer, com um volume de 50 mL cada e iniciou-se imediatamente a quantificação da biomassa através de leitura da D.O. 640 nm pelo espectrofotômetro, como referido em 3.2.3.. Durante o crescimento celular os balões foram mantidos em agitação orbital a 120 rpm, a 25 °C.

Tabela 4 – Quantidade de Na₂SeO₃ adicionado a 300 mL de meio YEPD.

| [Se] (µg mL ⁻¹) | Na ₂ SeO ₃ (g) |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| 0 | ----- |
| 5 | 0,0015 |
| 250 | 0,0751 |

3.5. Avaliação da tolerância das diferentes estirpes ao Se

Este ensaio consistiu na avaliação da perda de viabilidade celular das leveduras das espécies *C. zemplinina*, *H. guilliermondii*, *H. uvarum*, *L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii* em meio YEPD líquido com diferentes concentrações de selênio (0 µg mL⁻¹; 5 µg mL⁻¹ e 100 µg mL⁻¹).

3.5.1. Preparação do inóculo

A preparação do inóculo, foi realizada por transferência de uma ansada de biomassa fresca (proveniente da placa com meio YEPD sólido), para um balão de Erlenmeyer de 100 mL, contendo 20 mL de meio YEPD. As culturas foram incubadas, com agitação orbital, a 120 rpm, a 25 °C, O/N. Foi feita a contagem do número de células viáveis, presentes na suspensão de células do inóculo. Foi usado um inóculo de 2 % (v/v).

3.5.2. Condições de crescimento

Ao meio de cultura YEPD líquido foram adicionadas diferentes quantidades de Na₂SeO₃ conforme referido na tabela 5, obtendo-se concentrações finais de 0 µg mL⁻¹; 5 µg mL⁻¹ e 100 µg mL⁻¹. Este meio foi preparado num único frasco com um volume de 300 mL e posteriormente foi transferido para frascos de 100 mL onde foi feita a inoculação num volume total de 100 mL e 2 % (v/v) de inóculo. De cada concentração ensaiada foram feitos duplicados.

Após inoculação o meio foi dividido por dois balões de Erlenmeyer, com um volume de 50 mL cada e iniciou-se imediatamente a quantificação da biomassa através de leitura da D.O. 640 nm pelo espectrofotômetro, como referido em 3.2.3.. Durante o crescimento celular os balões foram mantidos em agitação orbital a 120 rpm, a 25 °C.

Tabela 5 – Quantidade de Na₂SeO₃ adicionado a 300 mL de meio YEPD.

| [Se] (µg mL ⁻¹) | Na ₂ SeO ₃ (g) |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| 0 | ----- |
| 5 | 0,0015 |
| 100 | 0,0030 |

3.6. Determinação da actividade enzimática

Foram realizados ensaios de determinação da actividade enzimática em seis estirpes de levedura da espécie *S. cerevisiae*, *H. uvarum* e *T. delbrueckii* crescidas em concentrações de Se de 0 µg mL⁻¹, 5 µg mL⁻¹ e 250 µg mL⁻¹; e *C. zemplinina*, *H. guilliermondii* e *L. thermotolerans* crescidas em concentrações de Se de 0 µg mL⁻¹, 5 µg mL⁻¹ e 100 µg mL⁻¹.

3.6.1. Preparação do inóculo

A preparação do inóculo, foi realizada por transferência de uma ansada de biomassa fresca (proveniente da placa com meio YEPD sólido), para um balão de Erlenmeyer de 100 mL, contendo 20 mL de meio YEPD. As culturas foram incubadas, com agitação orbital (Fitoclima 750 E, Aralab), a 120 rpm, a 25 °C, O/N. Foi usado um inóculo de 2 % (v/v).

3.6.2. Condições de crescimento

Ao meio de cultura YEPD foram adicionadas diferentes quantidades de Na₂SeO₃ conforme referido na tabela 6, obtendo-se concentrações finais de 0 µg mL⁻¹; 5 µg mL⁻¹; 100 µg mL⁻¹ e 250 µg mL⁻¹. Este meio foi preparado num frasco com um único volume de 300 mL. Este volume foi dividido em frascos de 100 mL onde foi feita a inoculação com a suspensão de cada levedura foi realizada num volume total de 100 mL.

Após inoculação o meio foi dividido para três balões de Erlenmeyer, com um volume de 25 mL cada onde o crescimento das células decorreu durante 24 h em agitação orbital a 120 rpm, a 25 °C.

Tabela 6 – Quantidade de Na_2SeO_3 adicionado a 300 mL de meio YEPD.

| [Se] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Na_2SeO_3 (g) |
|--------------------------------|-------------------------------|
| 0 | ----- |
| 5 | 0,0015 |
| 100 | 0,0300 |
| 250 | 0,0750 |

3.6.3. Preparação dos extractos

A preparação dos extractos para quantificação da proteína solúvel e da actividade enzimática foram realizados com base no método descrito por Bronzetti *et al.* (2001).

A recolha de amostra foi realizada após 24 h de crescimento. As células foram recolhidas por centrifugação a 7 °C, 3 500 rpm, 5 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em 5 mL de solução tampão fosfato 0,1 M (ver em Anexo I) e centrifugou-se novamente durante 5 minutos, a 3 500 rpm, 7 °C. O sedimento foi recolhido para tubos *ependorf* com aproximadamente 0,5 mL de esferas de vidro (0,3 – 0,4 mm).

Procedeu-se à lise das células por agitação em vórtex durante 2 minutos, arrefecendo-se no gelo durante 4 h. De seguida, centrifugou-se a 12 000 rpm, 4 °C durante 5 minutos, de modo a eliminar os restos celulares e células intactas. O sobrenadante foi removido para um novo *ependorf*. Procedeu-se ao seu congelamento em azoto líquido, submergindo os tubos durante 10 minutos. Os extractos preparados foram mantidos em câmara de congelação (- 80 °C) até à determinação da actividade enzimática das várias enzimas (ascorbato-peroxidase, catalase, glutathiona-peroxidase, glutathiona-redutase, superóxido-dismutase) e à determinação do teor de proteína solúvel.

Para a determinação da actividade enzimática das enzimas ascorbato-peroxidase (APX) e glutathiona-peroxidase (GPX), foi utilizado o mesmo procedimento de preparação dos extractos, utilizando uma solução tampão Tris-HCL com adição de 10 mM de ascorbato e 5 mM de cisteína respectivamente. De cada concentração ensaiada foram preparados extractos em triplicado.

3.6.4. Determinação do teor de proteína solúvel

A quantificação da proteína solúvel a partir dos extractos preparados para a determinação da actividade enzimática foi efectuada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), que se baseia na ligação do corante azul de Coomassie BG-250 com grupos funcionais básicos ou aromáticos das proteínas. Para a execução deste método foram utilizados 100 μL de amostra com 6 mL de reagente de Bradford (Coomassie azul brilhante G-250). O reagente de Bradford foi preparado de acordo com Bradford (1976).

De seguida, efectuaram-se as leituras de absorvância a 595 nm, no espectrofotómetro (Hitachi U-2000 UV/Vis Spectrophotometer). A quantificação foi feita de acordo com a recta padrão $y = 0,3066x + 0,001$ (onde x e y representam, respectivamente, a concentração de proteína e absorvância), $R^2 = 0,9791$ obtida com soluções de soro albumina bovina (BSA) numa gama de concentração entre 0 e 1 mg mL^{-1} . Todas as determinações efectuadas foram realizadas utilizando amostras obtidas em triplicado e em que as leituras foram repetidas duas vezes de forma a garantir a reprodutibilidade dos resultados.

3.6.5. Determinação da actividade enzimática

As leituras da actividade enzimática das diversas enzimas testadas foram realizadas num espectrofotómetro com registador computadorizado (Hitachi U-2000 UV/Vis Spectrophotometer), tendo sido utilizados métodos contínuos que permitem medir a velocidade da reacção em função do tempo.

Todas as determinações efectuadas foram realizadas utilizando amostras obtidas em triplicado e em que as leituras foram repetidas duas vezes. Foram usados métodos específicos de determinação da actividade enzimática para cada uma das enzimas existentes nos extractos. Neste trabalho a actividade enzimática foi expressa em U mg^{-1} de proteína, isto é, em actividade específica (actividade enzimática relacionada com o teor de proteína da amostra). Todas as determinações de actividade enzimática foram efectuadas à temperatura ambiente do laboratório.

A quantidade de enzima presente numa amostra é estimada pela sua actividade enzimática, isto é, pela quantidade de produto formado por unidade de tempo, em condições bem definidas, o que se deve ao facto de a velocidade das reacções catalisadas por enzimas ser directamente proporcional à quantidade de enzima existente (Baptista, 2009 citando Ricardo e Teixeira, 1979).

3.6.5.1. Ascorbato-peroxidase (APX)

Uma unidade de actividade enzimática é definida como a quantidade de ascorbato-peroxidase necessária para catalisar a oxidação de 1 μmol de ascorbato por minuto e por mL, nas condições do ensaio.

A determinação da actividade da enzima APX consistiu no método contínuo referido por Sharma e Dubey (2004), em que a determinação da velocidade inicial é efectuada a partir da oxidação do ascorbato a uma absorvância de 290 nm, durante 2 minutos. A actividade enzimática foi determinada num meio reaccional contendo 1 mM de ascorbato e 0,1 mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 100 mM de tampão fosfato (pH 7,6) e 2,5 mM de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e 0,05 mL de extracto preparado como referido em 3.6.3., utilizando um coeficiente de absorvidade molar (ϵ) de 0,28 $\text{mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$ (Garnczarska, 2005).

3.6.5.2. Catalase (CAT)

A determinação da actividade da catalase foi realizada com base no método descrito por Aebi (1983) referido em Bergmeyer (1983), em que a determinação da velocidade inicial é efectuada a partir da taxa de diminuição de absorvância devido à decomposição do H_2O_2 , sendo a diminuição de absorvância proporcional à quantidade de enzima presente. Uma unidade de actividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a decomposição de 1 μmol de H_2O_2 por minuto, a 25 °C, nas condições do ensaio.

As leituras da actividade enzimática foram efectuadas a um comprimento de onda de 240 nm, durante 2 minutos, usando um ϵ de 3,94 $\text{mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$ (Bergmeyer, 1983). A actividade enzimática foi determinada num meio reaccional contendo 100 mM de tampão fosfato, 30 mM de H_2O_2 em tampão fosfato (100 mM) a pH 7,6 e 0,05 mL de extracto preparado como referido em 3.6.3..

3.6.5.3. Glutathiona-peroxidase (GPX)

A determinação da actividade da enzima GPX foi efectuada por adaptação do método descrito por Aravind e Prasad (2005), pela medição da diminuição da absorvância resultante do consumo de NADPH. Uma unidade de actividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a oxidação de 1 μmol de glutathiona por minuto, a 25 °C, nas condições do ensaio.

A actividade enzimática da GPX foi determinada num meio reaccional contendo solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,9; 1,14 M cloreto de sódio (NaCl), 10 mM GSH; 2,5 mM H_2O_2 ; 0,1 mM NADPH e glutathiona-redutase e 0,05 mL de extracto preparado em 3.6.3.. A leitura

da variação de absorvância, foi efectuada a 340 nm, durante 2 minutos, usando um ϵ de $0,62 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$ (Aravind e Prasad, 2005).

3.6.5.4. Glutathiona-redutase (GR)

A determinação da actividade da enzima GR foi efectuada por adaptação do método descrito por Shanker *et al.* (2004), baseada no aumento da absorvância resultante da redução do ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) pela glutathiona reduzida (GSH) produzida. Uma unidade de actividade enzimática é definida como a quantidade de glutathiona-redutase necessária para reduzir $1 \mu\text{mol}$ de glutathiona oxidada (GSSG) por minuto a 25°C , nas condições do ensaio.

A actividade enzimática foi determinada num meio reaccional contendo $0,75 \text{ mM}$ de DTNB, $0,1 \text{ mM}$ de nicotinamida adenina dinucleotido-fosfato (NADPH), em tampão fosfato $0,1 \text{ M}$ contendo 1 mM de EDTA, a pH 7,6 e $0,05 \text{ mL}$ de extracto preparado como referido em 3.6.3.. A reacção foi iniciada com a adição de 1 mM de GSSG. A leitura no espectrofotómetro, foi efectuada a 412 nm , durante 2 minutos, usando um ϵ de $0,62 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$ (Shanker *et al.*, 2004).

3.6.5.5. Superóxido-dismutase (SOD)

A determinação da actividade da enzima SOD foi realizada com base no método descrito por Rubio *et al.* (2002). Baseia-se no facto do citocromo C-férrico (CitC-Fe^{3+}) ser reduzido na presença dos iões superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), originando uma coloração rosa, resultante da presença de iões Fe^{2+} . Os iões superóxido são produzidos numa reacção catalisada pela enzima xantina-oxidase. A SOD existente nas amostras vai competir com o CitC-Fe^{3+} para ser reduzido pelos iões superóxido existentes, havendo assim uma menor quantidade de CitC-Fe^{2+} e, consequentemente, menor formação do produto corado. Uma unidade de actividade enzimática é definida como quantidade de SOD necessária para inibir a redução do citocromo C-férrico por minuto em 50 %, nas condições de ensaio.

A actividade enzimática foi determinada num meio reaccional contendo uma solução produtora de superóxido ($0,5 \text{ mM}$ de xantina; $0,05 \text{ mM}$ de citocromo-C-férrico; $0,1 \text{ mM}$ de EDTA) e a reacção é iniciada pela adição de solução de xantina-oxidase em 100 mM de tampão fosfato de potássio a pH 7,6 e $0,05 \text{ mL}$ de extracto preparado como referido em 3.6.3.. A leitura no espectrofotómetro, foi efectuada a 550 nm , durante 1-2 minutos. Uma unidade de actividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a redução do CitC-Fe^{3+} em 50 % por minuto a 25°C , nas condições do ensaio (Rubio *et al.*, 2002).

3.7. Fermentação

O ensaio de fermentação foi realizado em mosto pasteurizado (110 °C, 30 min.). Este mosto foi preparado a partir de uvas da casta Seara Nova, provenientes das vindimas de 2010, encontrando-se em garrafas de 0,75 L mantidas à temperatura ambiente. O mosto foi sujeito a um processo de decantação, com o objectivo de lhe serem removidos os sólidos sedimentados que se encontravam na base da garrafa e colocou-se o mosto num único recipiente para homogeneização. Foi posteriormente feita nova pasteurização (110 °C, 30 min.). Após pasteurização foi retirado 50 mL para análise dos parâmetros físico-químicos do mosto (açúcares, massa volúmica, grau provável, pH e acidez total) (ver em Anexo II).

Foram realizadas fermentações com as leveduras *S. cerevisiae* EVN 166 e *T. delbrueckii* EVN 1141 em duas modalidades, sem selénio e pré-enriquecidas em meio com 5 µg mL⁻¹ de selénio. As fermentações foram realizadas em triplicado.

3.7.1. Preparação do inóculo

A preparação do inóculo, foi realizada por transferência de uma ansada de biomassa fresca (proveniente da placa com meio YEPD sólido), para um balão de Erlenmeyer de 100 mL, contendo 20 mL de meio YEPD. As culturas foram incubadas, com agitação orbital, a 120 rpm, a 25 °C durante 24 h. No momento da adição do inóculo, foi feita a contagem do número de células totais em hemocitómetro. Foi usado um inóculo de 2 % (v/v).

3.7.2. Condições de crescimento

Ao meio de cultura YEPD foi adicionado 0,5001 g de Na₂SeO₃, obtendo-se a concentração final de 5 µg mL⁻¹. Este meio foi preparado num único frasco com volume de 100 mL e foi dividido em dois balões de Erlenmeyer com um volume de 50 mL cada.

O pré-enriquecimento das células de levedura *S. cerevisiae* foi realizado em 2 balões de Erlenmeyer com meio de cultura YEPD com 0 µg mL⁻¹ e 5 µg mL⁻¹ de Se e feita a inoculação com 2 % (v/v) de inóculo. O pré-enriquecimento decorreu durante 48 h em agitação orbital a 120 rpm, 25 °C.

A recolha da amostra foi realizada após 48 h de crescimento. As células foram recolhidas por centrifugação durante 5 minutos, a 3 500 rpm, 7 °C de 10 mL da suspensão de leveduras. O sedimento foi ressuspensionado em 10 mL de solução triptona sal para lavagem do sedimento e centrifugou-se novamente durante 5 minutos, a 3 500 rpm, 7 °C. Foi removido o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensionado num pequeno volume de mosto e transferido para frascos de 500 mL com tampa com membrana (Schott, GL- 45,

ISO 4796:2000), contendo 300 mL de mosto. Procedeu-se à contagem numa das réplicas (réplica 1) do número de células viáveis no mosto logo após inoculação.

De seguida, colocaram-se os frascos numa câmara a 25 °C, sem agitação. A fermentação foi monitorizada através de pesagens, duas vezes ao dia durante 25 dias. Para controlo foi usado um frasco de 500 mL com tampa com membrana contendo 300 mL de mosto sem inoculação. Na figura 2 encontra-se o esquema do ensaio de fermentação com a levedura *S. cerevisiae* EVN 166 nas duas modalidades, sem selénio (Sc 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Se; Td 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Se) e pré-enriquecidas em meio com 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selénio (Sc 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Se; Td 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Se). Para a fermentação com levedura *T. delbrueckii* EVN 1141 foi utilizado o mesmo procedimento.

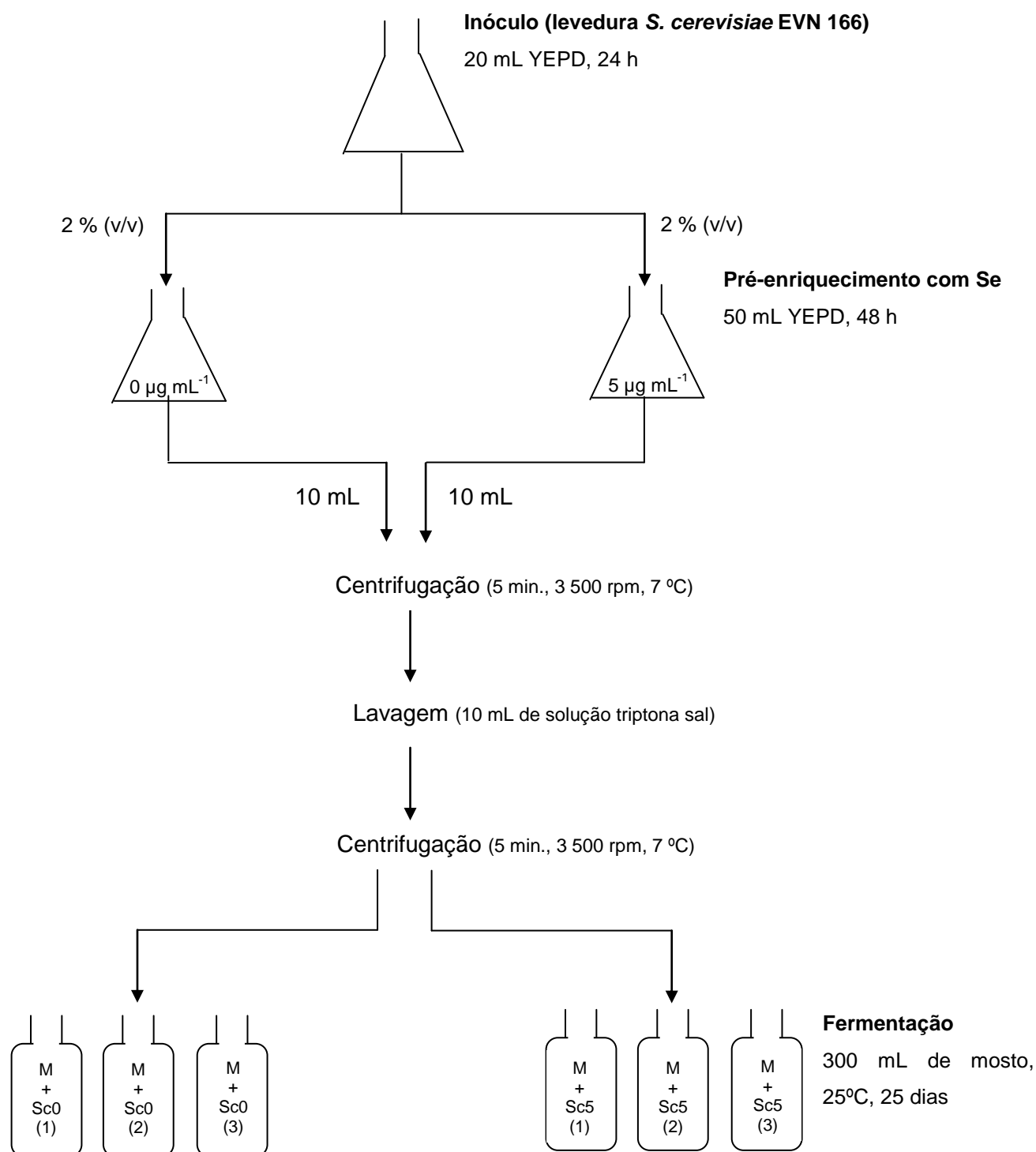


Figura 2 - Representação esquemática do ensaio de fermentação com levedura *S. cerevisiae* EVN 166.

3.7.3. Análise dos parâmetros físico-químicos do mosto fermentado

Relativamente aos parâmetros físico-químicos foram retiradas amostras ao 25º dia de fermentação, para determinação dos açúcares (g L^{-1}), teor alcoólico volúmico (% v/v), pH, acidez total ($\text{g ácido tartárico L}^{-1}$) e acidez volátil ($\text{g ácido acético dm}^{-3}$) por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) Winescan FT-120, Foss.

3.7.4. Determinação do Se total no mosto fermentado

3.7.4.1. Amostragem

No início (t_0) foram retirados 18 mL de mosto sem inoculação para um tubo Falcon de 50 mL e adicionado 2 mL de ácido nítrico (HNO_3) para posterior decomposição da matéria orgânica. Ao fim de 25 dias de fermentação foram retirados 18 mL de mosto fermentado com as leveduras *S. cerevisiae* EVN 166 e *T. delbrueckii* EVN 1141 pré-enriquecidas em meio com $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de selénio, que se centrifugou a 3 500 rpm, 5 minutos, a 7 °C. O sobrenadante, cerca de 16 mL, foi recolhido para um tubo Falcon de 50 mL e adicionado de 2 mL de HNO_3 para decomposição da matéria orgânica. As amostras foram mantidas a 4 °C até à digestão das amostras. Na figura 3 encontra-se representado o esquema de recolha das amostras.

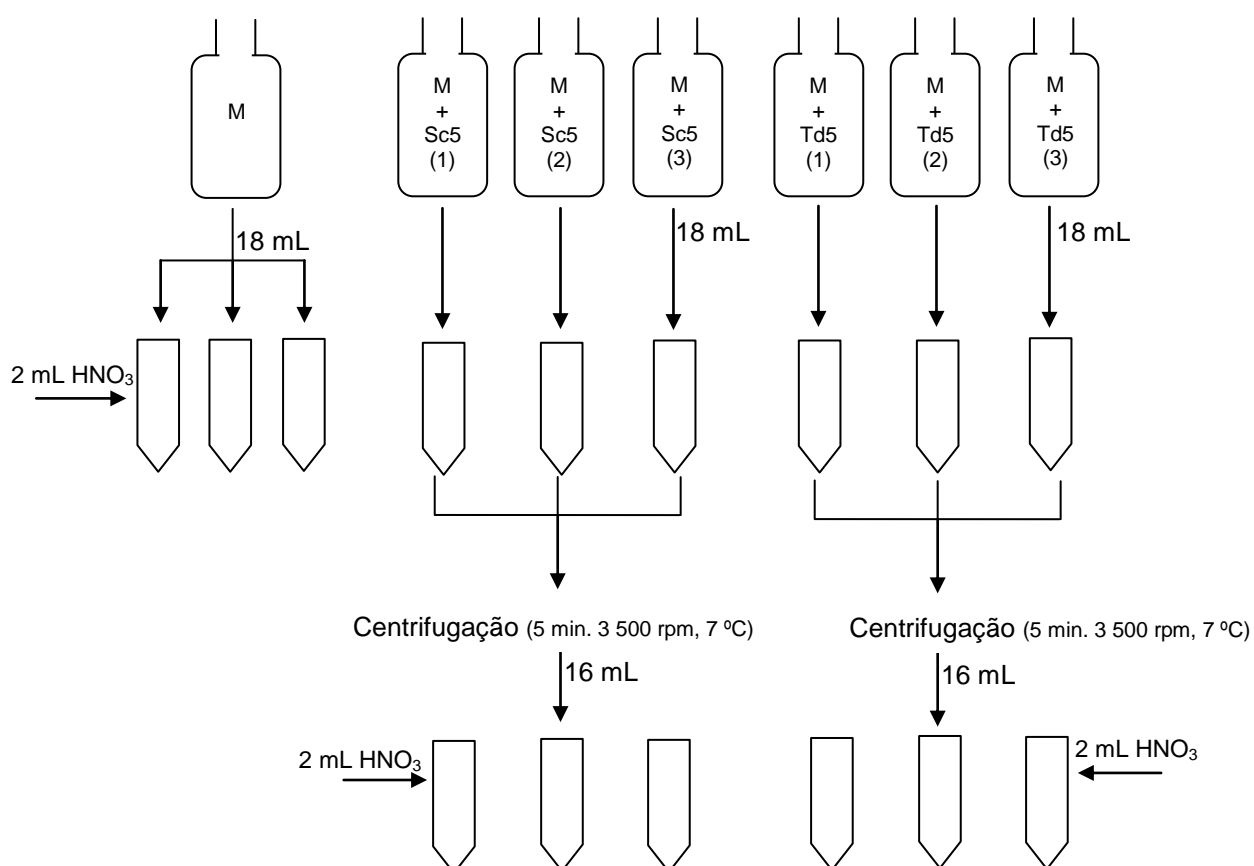


Figura 3 - Representação esquemática da recolha das amostras.

3.7.4.2. Processo de digestão das amostras

Procedeu-se à mineralização das amostras com recurso à técnica de digestão por via húmida, em vaso fechado, por microondas (sistema de alta pressão), com vista à análise elementar por espectrofotometria de massa acoplado a plasma indutivo (ICP-MS).

Foram colocados em cinco vasos TFM Teflon 2 mL de amostra, 4 mL de H₂O, 1 mL de HNO₃ e 1 mL de H₂O₂ e num vaso TFM Teflon 5 mL de H₂O e 3 mL de H₂O₂. Procedeu-se à decomposição da matéria orgânica em microondas (MLS 1 200 mega, Milestone Inc., Shelton, CT). Após digestão as amostras foram transferidas para um tubo Falcon de 50 mL e adicionados 12 mL de solução de 0,1 % HNO₃ perfazendo um volume total de 20 mL. As amostras foram mantidas a 4 °C até à análise por ICP-MS.

Para eliminar possíveis contaminações, todo o material utilizado para análise mineral foi sujeito a tratamento de descontaminação, numa solução de HNO₃ a 20 % (v/v) durante 24 h e após esse período passado abundantemente por água ultra-pura e seco em estufa.

3.7.4.3. Análise por ICP-MS

A determinação da concentração de selénio no mosto sem inoculação e do mosto fermentado com as leveduras da espécie *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii* pré-enriquecidas em selénio foi realizada por ICP-MS, Perkin Elmer SCIEX Elan 9000, segundo o método descrito por Catarino *et al.* (2006). As determinações foram realizadas em amostras obtidas nos triplicados de fermentação e para cada amostra foi preparada em duplicado.

3.8. Tratamento estatístico

O tratamento estatístico dos resultados dos ensaios enzimáticos consistiu na análise de variância a um factor (ANOVA), para avaliar o efeito das três concentrações de selénio em cada uma das estirpes de levedura. Para este efeito, foi usado o software SPSS 13.0 e o teste de Tukey para comparação das médias, para um nível de significância de 95 %.

Para os resultados dos parâmetros físico-químicos do ensaio de fermentação foi usado o software SPSS 13.0 e o teste t para comparação das médias, para um nível de significância de 95 %.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaio de tolerância da levedura *S. cerevisiae* na presença de Se durante 24 h

Este ensaio preliminar visou avaliar o efeito inibitório de diferentes concentrações de Se sobre o crescimento da levedura *S. cerevisiae* EVN 166. Neste ensaio usou-se apenas uma estirpe de levedura *S. cerevisiae*, com o objectivo de delinear as concentrações que deveriam ser utilizadas no ensaio completo descrito mais à frente neste relatório que incluirá seis estirpes de leveduras de espécies diferentes.

Ao meio de cultura YEPD foi adicionado selénio em concentrações de Se que variaram entre 5,6 e 94,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Este meio foi adicionado de um inóculo fresco de células da espécie *S. cerevisiae* (concentração aproximada de 10^7 células de levedura por mL) previamente crescidas em meio YEPD O/N. O ensaio decorreu durante 24 h, a 25 °C e sob agitação (120 rpm). As concentrações ensaiadas foram seleccionadas com base num trabalho realizado anteriormente no INIA – Dois Portos, em que foram feitos ensaios prévios em meio de cultura líquido e sólido com diferentes concentrações de Se (1, 2, 5, 10, 20, 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em diferentes estirpes de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

Na tabela 7 encontram-se os resultados da contagem do número de células viáveis presentes no meio de cultura após 24 h de crescimento para as diferentes concentrações ensaiadas. O número de células viáveis corresponde ao número de células capazes de formar colónias num meio de cultura sólido com composição adequada ao crescimento da levedura. Assume-se que cada colónia é originada a partir de uma única célula viável. Os resultados são expressos em Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC mL^{-1}).

Tabela 7 – Número de células viáveis no meio de cultura.

| [Se] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | UFC mL^{-1} |
|--------------------------------|----------------------|
| 0,0 | TNTC* |
| 5,6 | $2,09 \times 10^8$ |
| 34,8 | $2,17 \times 10^8$ |
| 49,7 | $2,70 \times 10^8$ |
| 94,0 | $1,29 \times 10^8$ |

*TNTC – Demasiado numeroso para contagem (contagem realizada na diluição 10^{-6})

O número de células viáveis após 24 h de crescimento é idêntico para as concentrações de selénio ensaiadas, embora se tenha observado um valor ligeiramente inferior de UFC mL⁻¹ para a concentração de 94,0 µg mL⁻¹.

É de realçar que todas as colónias que se observaram ao longo do ensaio apresentavam características macromorfológicas semelhantes entre si, brancas, de aspecto baço, cremoso e de forma redonda.

4.2. Ensaio de tolerância da levedura *S. cerevisiae* na presença de Se durante 2 h, 6 h e 24 h

Face aos resultados obtidos no ensaio anterior, referido em 4.1. foi delineado um novo ensaio que teve como objectivo avaliar o efeito inibitório de concentrações mais elevadas de Se e diferentes tempos de contacto sobre o crescimento da levedura *S. cerevisiae* EVN 166. Ao meio de cultura YEPD foram adicionadas diferentes quantidades de selénio obtendo-se concentrações finais de 500 µg mL⁻¹, 5 000 µg mL⁻¹ e 25 000 µg mL⁻¹. Este meio foi inoculado com uma concentração de inóculo de aproximadamente 10⁶ células de levedura por mL a partir da suspensão de células previamente crescidas em meio YEPD O/N. O crescimento decorreu a 25 °C e sob agitação (120 rpm), tendo sido retiradas amostras às 2 h, 6 h e 24 h.

Na tabela 8 encontram-se os resultados da contagem do número de células viáveis presentes no meio de cultura após 2 h, 6 h e 24 h de crescimento, para as diferentes concentrações ensaiadas. Os resultados são expressos em Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC mL⁻¹).

Tabela 8 – Número de células viáveis no meio de cultura.

| [Se] (µg mL ⁻¹) | 2 h (UFC mL ⁻¹) | 6 h (UFC mL ⁻¹) | 24 h (UFC mL ⁻¹) |
|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| 0 | 1,87 × 10 ⁸ | 3,63 × 10 ⁸ | TNTC* |
| 500 | 1,58 × 10 ⁸ | 2,82 × 10 ⁸ | 7,64 × 10 ⁷ |
| 5 000 | 1,18 × 10 ⁶ | <1 | <1 |
| 25 000 | 2,18 × 10 ⁶ | <1 | <1 |

*TNTC – Demasiado numeroso para contagem (contagem realizada na diluição 10⁻⁶)

Observa-se que o número de células viáveis na ausência de Se (0 µg mL⁻¹) aumenta à medida que o tempo de crescimento aumenta. Na concentração de 500 µg mL⁻¹ após 24 h de crescimento houve uma redução do número de células viáveis de uma potência de 10.

Nas concentrações de 5 000 e 25 000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ocorreu uma redução acentuada do número de células viáveis após 6 h (contagem na diluição 10^{-5}) e 24 h (contagem na diluição 10^{-3}) de exposição ao Se, o que significa provavelmente a morte celular.

4.3. Avaliação da tolerância da levedura *S. cerevisiae* ao Se

Neste ensaio foi registrada a densidade óptica do meio de cultura durante o crescimento da levedura *S. cerevisiae* EVN 166 em presença de Se.

Ao meio de cultura YEPD foram adicionadas diferentes quantidades de Na_2SeO_3 obtendo-se concentrações finais de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Este meio foi inoculado com uma concentração de inóculo de aproximadamente 10^7 células de levedura por mL a partir da suspensão de células previamente crescidas em meio YEPD O/N. O crescimento decorreu a 25 °C e sob agitação (120 rpm), com acompanhamento através da leitura da D.O. 640 nm.

Na figura 4 apresentam-se as curvas de crescimento da levedura da espécie *S. cerevisiae* nas diferentes concentrações de Se ensaiadas.

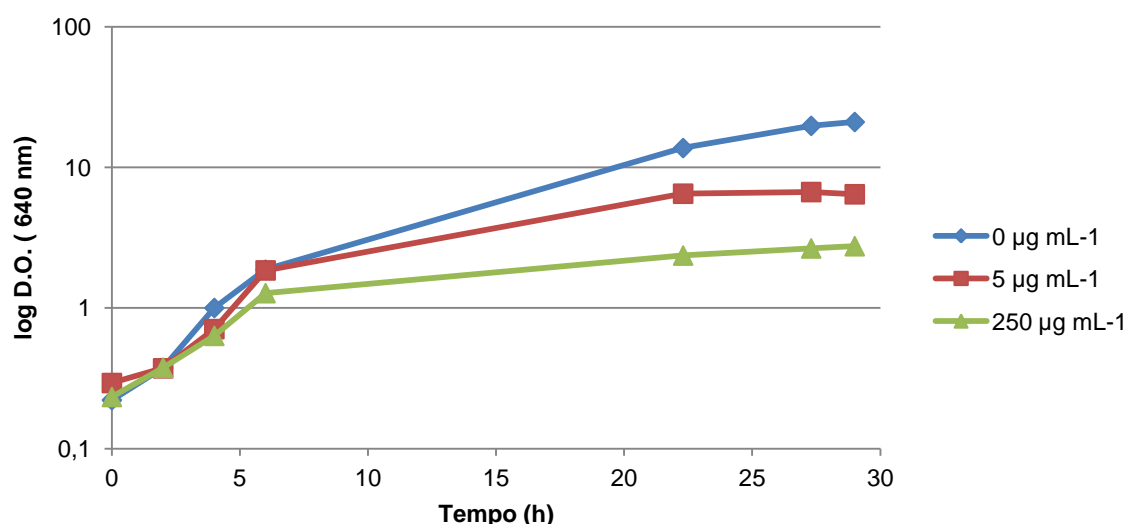


Figura 4 – Curvas de crescimento da levedura *S. cerevisiae* EVN 166 para diferentes concentrações de Se (0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Observa-se que até às 6 h o valor da D.O. registrado era idêntico nas três concentrações ensaiadas. A partir das 6 h a concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ diferenciou-se, apresentando uma densidade óptica menor que as restantes concentrações. As concentrações ensaiadas parecem ter um efeito inibitório sobre o crescimento da levedura. Ao final de 29 h o valor do log da D.O. no caso do ensaio sem Se atingiu um valor de 21,05, enquanto que as concentrações de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ atingiram valores da ordem de 6,45 e de 2,76, respectivamente.

4.4. Avaliação da tolerância das diferentes estirpes ao selênio

Neste ensaio foi seguido o crescimento das leveduras *C. zemplinina* EVN 1154, *H. guilliermondii* EVN 390, *H. uvarum* EVN 1117, *L. thermotolerans* EVN 372, *S. cerevisiae* EVN 166 e *T. delbrueckii* EVN 1141 em presença de Se.

Ao meio de cultura YEPD foram adicionadas diferentes quantidades de Na_2SeO_3 obtendo-se concentrações finais de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Este meio foi inoculado partir de uma suspensão de células previamente crescidas em meio YEPD O/N. O ensaio decorreu a 25°C , e sob agitação (120 rpm), com acompanhamento através da leitura da D.O. 640 nm. Na tabela 9 encontram-se os resultados da contagem do número de células viáveis presente no inóculo. Os resultados são expressos em Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC mL^{-1}).

Tabela 9 – Número de células viáveis no inóculo.

| Estirpe | UFC mL^{-1} |
|----------------------------------|----------------------|
| <i>C. zemplinina</i> EVN 1154 | $9,00 \times 10^7$ |
| <i>H. guilliermondii</i> EVN 390 | $2,40 \times 10^7$ |
| <i>H. uvarum</i> EVN 1117 | $2,82 \times 10^9$ |
| <i>L. thermotolerans</i> EVN 372 | $1,33 \times 10^8$ |
| <i>S. cerevisiae</i> EVN 166 | $3,20 \times 10^9$ |
| <i>T. delbrueckii</i> EVN 1141 | $1,18 \times 10^9$ |

Na figura 5 A, B e C apresentam-se as curvas de crescimento das estirpes de leveduras nas diferentes concentrações de Se ensaiadas. Observa-se que para as concentrações de $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ as curvas de crescimento são idênticas em todas as leveduras. Na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ a densidade óptica máxima atingida é menor que nas restantes concentrações.

Nas diferentes concentrações ensaiadas a levedura da espécie *H. guilliermondii*, apresenta uma fase de latência extensa. Mas apesar de ter um crescimento mais lento no início (aproximadamente 10 h), acaba por atingir o mesmo nível de crescimento celular das restantes leveduras. A levedura da espécie *H. uvarum* aparenta ser a mais sensível ao Se, dado que apresenta valores muito baixos de densidade óptica na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Se, quando comparado com as restantes concentrações ensaiadas.

Relativamente à levedura da espécie *T. delbrueckii* ao fim do mesmo tempo de crescimento e nas diferentes concentrações ensaiadas é a que apresenta valores de densidade óptica mais elevados e consequentemente atinge maiores concentrações celulares.

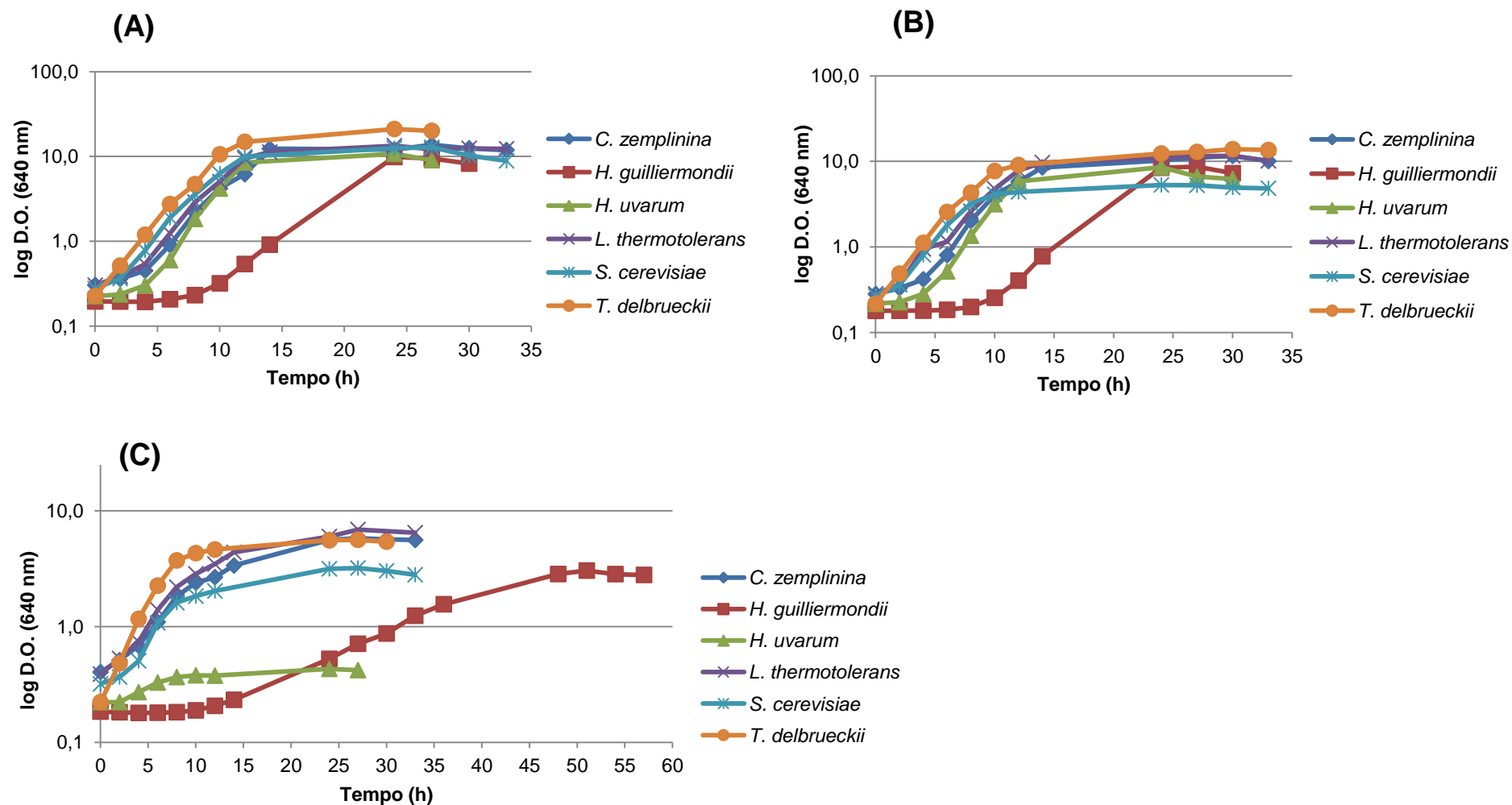


Figura 5 – Curvas de crescimento das seis estirpes de leveduras para diferentes concentrações de Se (A) 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (B) 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e (C) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.5. Avaliação do efeito do selénio no teor de proteína solúvel

A toxicidade dos metais pode resultar dos danos causados em processos celulares, designadamente danos nos componentes estruturais, desnaturação de proteínas e inactivação enzimática, podendo afectar os processos metabólicos vitais.

Neste ensaio foi avaliado o efeito tóxico do Se ao nível do teor de proteína solúvel nas seis estirpes de leveduras das espécies *C. zemplinina*, *H. guilliermondii*, *H. uvarum*, *L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, tendo sido utilizadas as estirpes que constam da tabela 1.

Inicialmente foi feita a determinação do teor de proteína solúvel nas leveduras da espécie *S. cerevisiae*, *H. uvarum* e *T. delbrueckii* em extractos de células crescidas em meio de cultura YEPD (25 mL) adicionado de selenito de sódio nas concentrações de 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As concentrações ensaiadas foram seleccionadas com base nos resultados prévios de tolerância referidos em 4.3.. Os resultados demonstraram que na concentração 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selénio o crescimento era muito diminuto, não permitindo obter suficiente massa celular, pelo que se baixou a concentração para 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selénio para as restantes leveduras testadas (*C. zemplinina*, *H. guilliermondii* e *L. thermotolerans*).

Nas leveduras das espécies *C. zemplinina*, *H. guilliermondii* e *L. thermotolerans* foi determinado o teor de proteína solúvel em extractos de células crescidas em meio de cultura YEPD (25 mL) adicionado de selenito de sódio nas concentrações de 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O crescimento decorreu durante 24 h, a 25°C, e sob agitação (120 rpm), após a inoculação com células previamente crescidas em meio YEPD (O/N).

Na figura 6 encontra-se representado o teor de proteína solúvel para as diferentes espécies de leveduras. Os níveis de proteína detectados variaram entre espécies, sendo mais elevados na levedura *L. thermotolerans* e mais baixos na levedura *H. uvarum*.

Em praticamente todas as espécies de leveduras estudadas, o teor de proteína solúvel desceu, com o aumento da concentração de selénio, com excepção da *C. zemplinina* (Figura 6 d), em que não se verificou uma diminuição significativa no teor de proteína para os diferentes níveis de Se testados, indicando não haver uma influência negativa do selénio na cultura estudada.

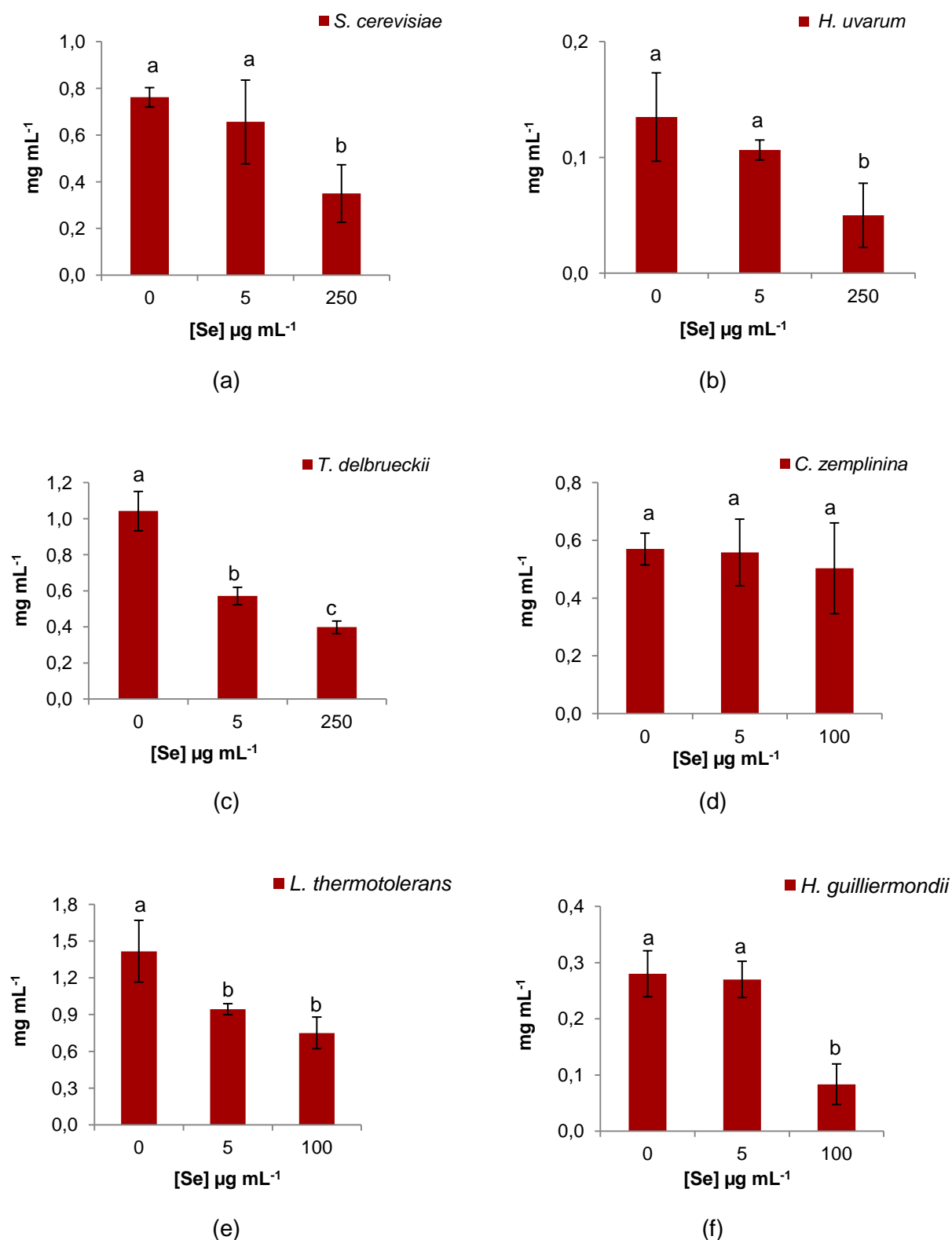


Figura 6 – Teor de proteína solúvel das espécies de leveduras estudadas pela exposição aos diferentes níveis de selênio testados. (a) *S. cerevisiae*, (b) *H. uvarum*, (c) *T. delbrueckii*, (d) *C. zemplinina*, (e) *L. thermotolerans*, (f) *H. guilliermondii*. As barras de erro representam as médias \pm desvio padrão dos triplicados realizados. Diferentes letras indicam as diferenças significativas para um nível de significância de 95 % ($p < 0,05$).

Nas leveduras *S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans* e *H. guilliermondii* (Figura 6 a, b, c, e, f) ocorreram alterações significativas nos teores de proteína nas concentrações 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selénio respectivamente. Por via das alterações significativas nos teores de proteína, infere-se que tenha ocorrido stresse oxidativo, que conduziu a uma diminuição do teor de proteína solúvel, afectando o metabolismo das leveduras. Em relação a levedura da espécie *C. zemplinina* (Figura 6 d), a exposição ao selénio não teve efeitos significativos no teor de proteína, indicando uma possível tolerância mais acentuada ao Se. De facto, para levedura da espécie *H. uvarum* (Figura 6 b) o crescimento foi muito inferior ao das outras espécies. Para a levedura da espécie *H. guilliermondii* (Figura 6 f) o período de fase lag foi muito mais longo embora se verifique depois uma recuperação nas taxas de crescimento observadas na figura 5.

Os danos na fracção proteica das células poderão ser uma consequência de indução de stresse oxidativo resultante do efeito tóxico do Se e consequente aumento na produção intracelular de ROS que causam danos oxidativos não só nas proteínas como também nos lípidos membranares, conduzindo à degradação das células e perda de viabilidade dos microrganismos estudados (Brenneisen *et al.*, 2005). A levedura da espécie *C. zemplinina* aparenta ser a mais tolerante às diferentes concentrações de Se.

No entanto, dado que se verificou uma resposta diferenciada das diferentes espécies estudadas, não só na determinação da proteína solúvel como também nas respectivas curvas de crescimento, foram de seguida determinados os efeitos do selénio na actividade enzimática das enzimas APX, CAT, GPX, GR e SOD.

4.6. Avaliação do efeito do selénio nos mecanismos antioxidantes enzimáticos

Neste ensaio foi avaliado o efeito do selénio na actividade enzimática das enzimas CAT, GR, SOD, APX e GPX, para avaliar a possível existência de mecanismos antioxidantes específicos nas seis estirpes de leveduras *C. zemplinina* EVN 1154, *H. guilliermondii* EVN 390, *H. uvarum* EVN 1117, *L. thermotolerans* EVN 372, *S. cerevisiae* EVN 166 e *T. delbrueckii* EVN 1141, que permitam justificar as diferentes tolerâncias observadas em resposta ao stresse induzido pelo Se.

Inicialmente foi feita a determinação da actividade enzimática nas leveduras da espécie *S. cerevisiae*, *H. uvarum* e *T. delbrueckii* em extractos de células crescidas em meio de cultura YEPD (25 mL) adicionado de selenito de sódio nas concentrações de 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados demonstraram que na concentração 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selénio o crescimento era muito diminuto, não permitindo obter suficiente massa celular, pelo que se baixou a concentração para 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selénio para as restantes leveduras testadas (*C. zemplinina*, *H. guilliermondii* e *L. thermotolerans*).

Nas leveduras das espécies *C. zemplinina*, *H. guilliermondii* e *L. thermotolerans* foi determinada actividade enzimática em extractos de células crescidas em meio de cultura YEPD (25 mL) adicionado de selenito de sódio nas concentrações de 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O crescimento decorreu durante 24 h, a 25°C, e sob agitação (120 rpm), após inoculação com células previamente crescidas em meio YEPD (O/N).

4.6.1. Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Na figura 7 encontram-se os resultados obtidos relativos à determinação da actividade enzimática das enzimas APX, CAT, GPX, GR e SOD na levedura *S. cerevisiae* EVN 166.

Pela análise dos gráficos da figura 7 (a), (c), (d), (e) observa-se um aumento na actividade enzimática da APX, GPX, GR e SOD com o aumento da concentração de selénio, provavelmente estará relacionado com o aumento dos níveis intracelulares de H_2O_2 .

Constata-se que a aplicação de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Se induziu significativamente a actividade das enzimas APX, GPX e SOD (Figura 7 a, c, e). Enquanto que a concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Se apesar de ter induzido um ligeiro aumento, a exposição das células a esta concentração não teve efeitos significativos.

Relativamente a actividade da enzima GR (Figura 7 d) aumentou significativamente com a aplicação de 5 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Se. No caso da enzima CAT, pelo contrário, a aplicação de 5 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Se inibiu significativamente a sua actividade (Figura 7 b). Esta diminuição poderá estar relacionada com uma produção excessiva de ROS, verificando-se que a CAT nestes organismos não parece estar envolvida nos mecanismos de resposta ao excesso de ROS.

Bronzetti *et al.* (2001) investigaram na levedura da espécie *S. cerevisiae*, os efeitos do Se em diferentes concentrações (172 μg ; 17,2 μg e 1,72 μg) e verificaram também que a actividade da CAT diminuiu e que actividade das enzimas SOD e GPX aumentava com o aumento da concentração de selénio. Pode concluir-se que a CAT nesta levedura não está envolvida no mecanismo de remoção do H_2O_2 formado em consequência do stresse induzido pelo Se, e parece não constituir um mecanismo de resposta antioxidativa.

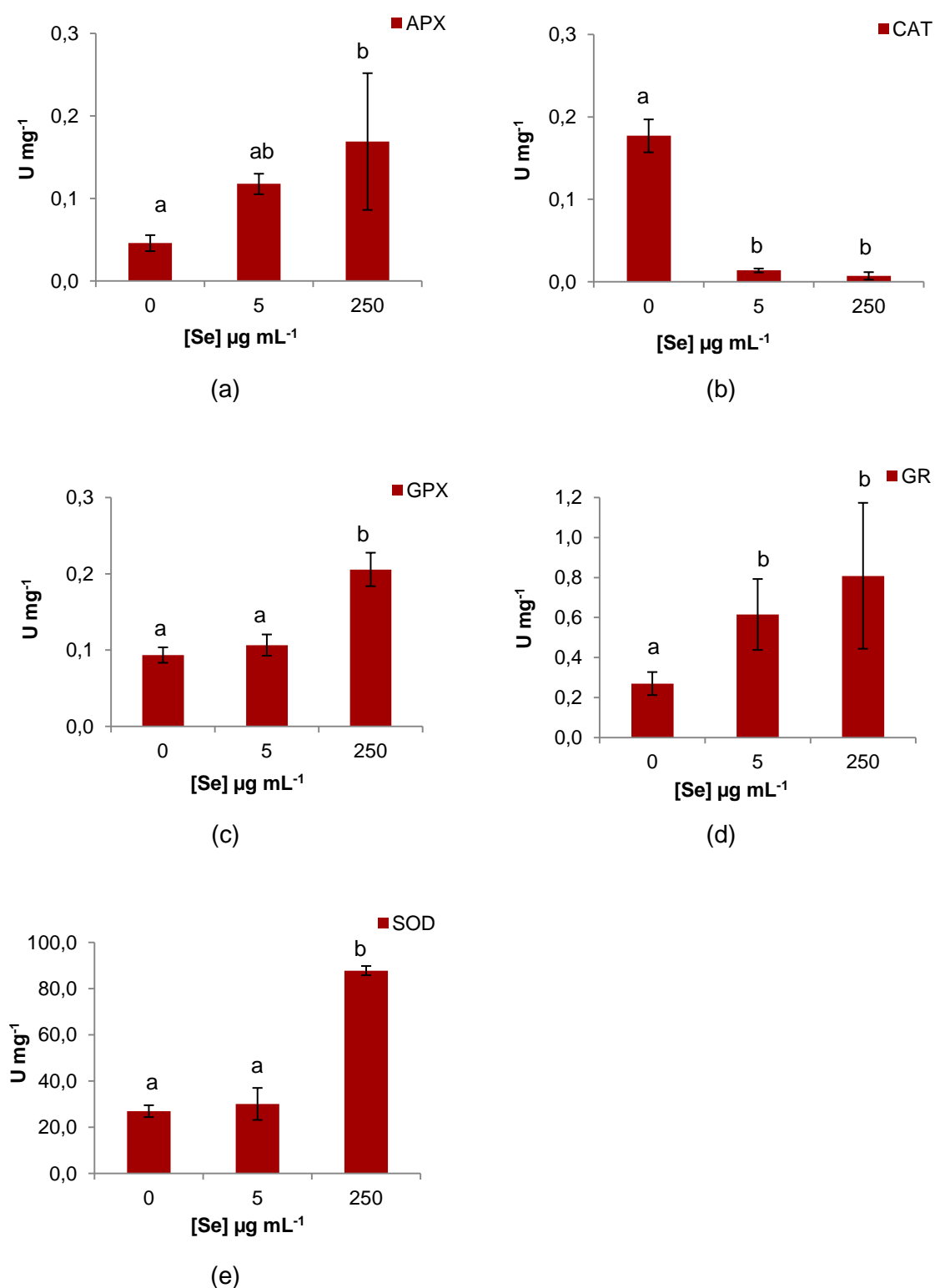


Figura 7 – Actividade enzimática da (a) APX, (b) CAT, (c) GPX, (d) GR, (e) SOD na levedura *S. cerevisiae* EVN 166. As barras de erro representam as médias \pm desvio padrão dos triplicados realizados. Diferentes letras indicam as diferenças significativas para um nível de significância de 95 % ($p < 0,05$).

Na levedura da espécie *S. cerevisiae* a SOD parece ser a principal enzima envolvida na remoção de ROS, estando de acordo com o descrito por Jamieson (2008). A Sod 1p ou Sod 2p converte o superóxido que é produzido na cadeia respiratória em H_2O_2 , e por sua vez a APX remove o H_2O_2 resultante, convertendo-o em água. Neste processo, a APX utiliza o ascorbato como agente redutor, que terá que ser regenerado, pelo potencial redutor da célula. Nesta função poderá ser fundamental o papel da glutathione reduzida (GSH), através da acção da GR e da GPX, utilizando o NADH (ou NADPH) intracelular. Este mecanismo poderá ser suportado pelo aumento verificado na actividade enzimática da GPX (Figura 7 d) e da GR (Figura 7 c) (Mittler, 2002; Perrone *et al.*, 2008). Esta resposta enzimática poderá contribuir para a tolerância ao Se verificada para esta levedura, como indicam as curvas de crescimento obtidas na figura 5.

4.6.2. Levedura *Hanseniaspora uvarum*

Na figura 8 encontram-se os resultados obtidos relativos à determinação da actividade enzimática das enzimas APX, CAT, GPX, GR na levedura *H. uvarum* EVN 1117.

Pela análise dos gráficos da figura 8, observa-se que a actividade enzimática da APX (Figura 8 a) e da GPX (Figura 8 c) aumentou significativamente ($p < 0,05$) com o aumento da concentração de Se, enquanto que em resposta oposta, a enzima GR (Figura 8 d) diminuiu significativamente com o aumento do teor de Se.

Na enzima CAT a concentração de $5 \mu g mL^{-1}$ de Se não afectou significativamente a sua actividade. Em resposta oposta a concentração de $250 \mu g mL^{-1}$ de Se inibiu significativamente a sua actividade enzimática.

Nesta levedura não foi detectada a actividade da SOD. Não foi possível obter informação na literatura sobre a não existência desta enzima que justificasse a não detecção da SOD neste ensaio. Pelo que se existir formação de radical superóxido, poderá não existir um mecanismo específico para a sua eliminação, uma vez que esta enzima é a única que é capaz de eliminar o poder tóxico causado pelo radical $O_2^{\bullet-}$, formando-se H_2O_2 que é posteriormente eliminado pela CAT ou através da APX (Gechev *et al.*, 2006). Dado que o radical superóxido é uma das primeiras espécies de ROS a ser formado em condições de stresse oxidativo, é muito reactivo e provoca danos oxidativos, esta pode ser uma hipótese para justificar a mais elevada sensibilidade desta levedura ao Se, nas condições do ensaio. Esta hipótese está de acordo com as curvas de crescimento, em que esta levedura aparenta ser a menos tolerante ao Se, como se observa nos gráficos da figura 5.

Assim, para a levedura da espécie *H. uvarum*, verificou-se apenas um aumento da actividade da APX (Figura 8 a) e da GPX (Figura 8 c) em resposta ao stresse induzido pelo Se. No entanto, a GR (Figura 8 d) diminuiu significativamente, o que leva a supor que não

existe suficiente GR activa, e que a regeneração da glutatona que suporta o mecanismo de remoção do H_2O_2 por estes sistemas enzimáticos poderá não ser suficientemente eficaz.

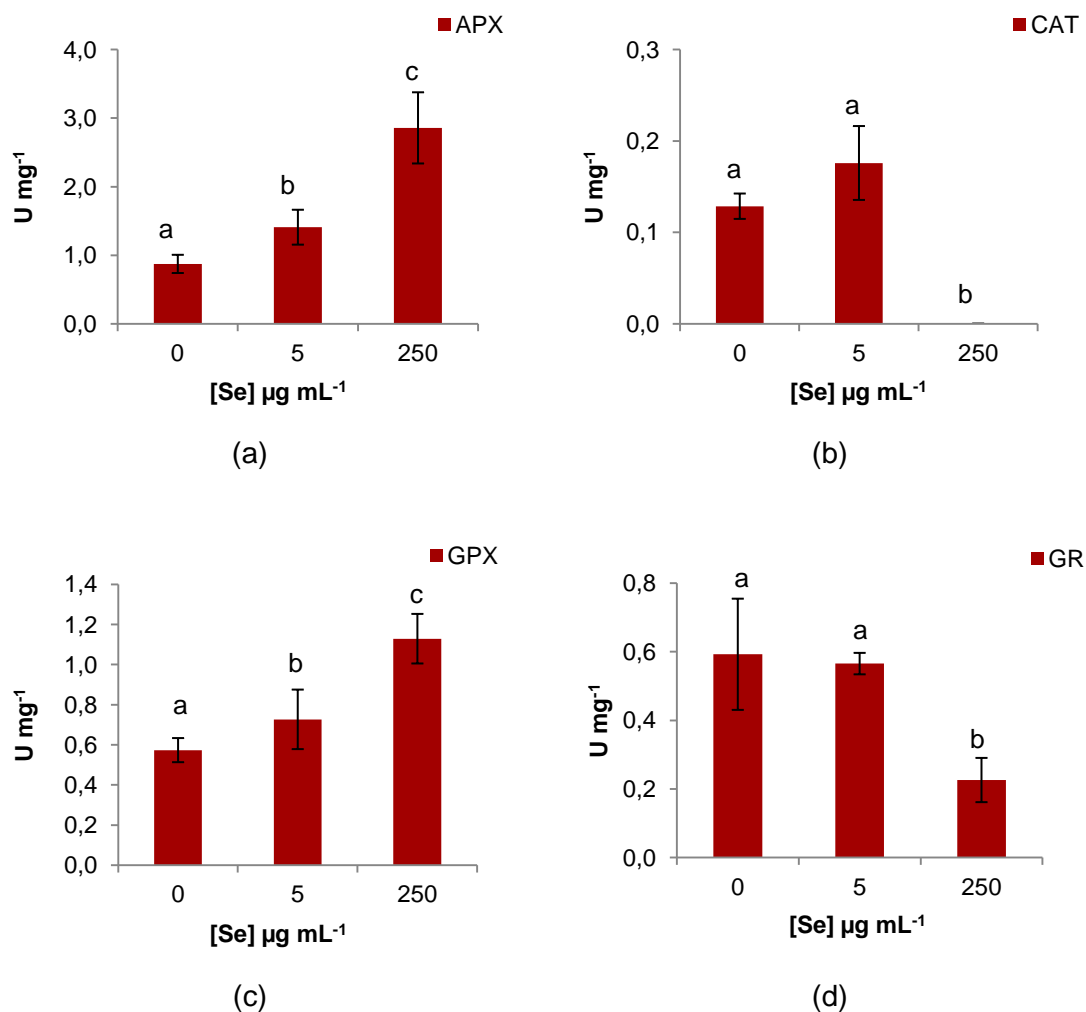


Figura 8 – Actividade enzimática da (a) APX, (b) CAT, (c) GPX, (d) GR na levedura *H. uvarum* EVN 1117. As barras de erro representam as médias \pm desvio padrão dos triplicados realizados. Diferentes letras indicam as diferenças significativas para um nível de significância de 95 % ($p < 0,05$).

4.6.3. Levedura *Torulaspora delbrueckii*

Na figura 9 encontram-se os resultados obtidos relativos à determinação da actividade enzimática das enzimas CAT, GPX, GR na levedura *T. delbrueckii* EVN 1141.

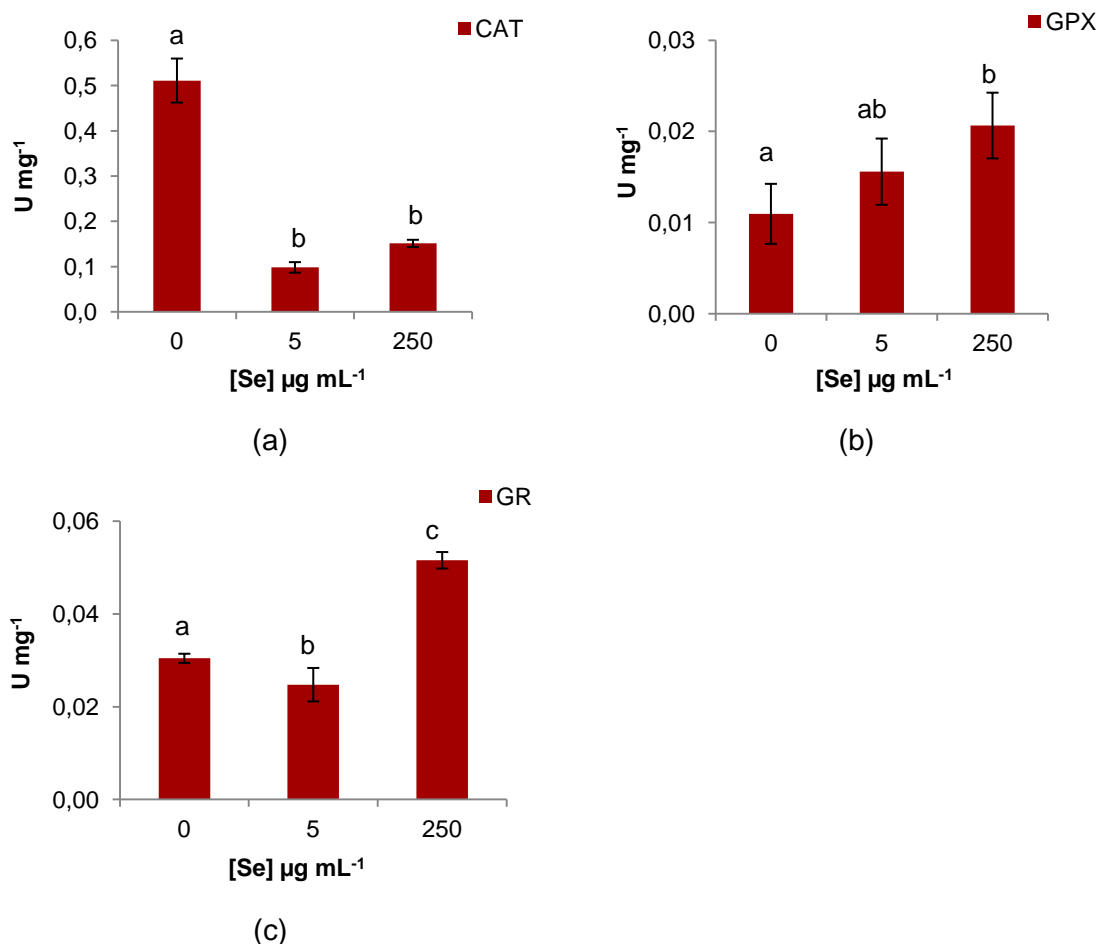


Figura 9 – Actividade enzimática da (a) CAT, (b) GPX, (c) GR, na levedura *T. delbrueckii* EVN 1141. As barras de erro representam as médias \pm desvio padrão dos triplicados realizados. Diferentes letras indicam as diferenças significativas para um nível de significância de 95 % ($p < 0,05$).

Pela análise dos gráficos da figura 9 (a) observa-se na enzima CAT que a aplicação de 5 e 250 µg mL⁻¹ de Se inibiu significativamente a actividade enzimática, tal como se tinha verificado na levedura da espécie *S. cerevisiae* (Figura 7).

Relativamente à actividade enzimática da GPX (Figura 9 b) e da GR (Figura 9 c) existe um aumento da actividade para a concentração de 250 µg mL⁻¹ Se o que poderá estar relacionado com uma resposta ao aumento de H₂O₂.

Contudo, não foi detectada a actividade das enzimas SOD e APX, responsáveis pela remoção do H_2O_2 e pela participação na protecção das células contra o stresse oxidativo. No entanto, o aumento da actividade enzimática da GPX e da GR poderá justificar a tolerância observada nas curvas de crescimento na figura 5 pela levedura da espécie *T. delbrueckii*, e o mecanismo de remoção de ROS pela acção destas enzimas é aparentemente suficiente para evitar danos nas células e causar a destruição celular.

No caso desta levedura é provável que a eliminação do excesso de H_2O_2 seja realizada pela glutathiona reduzida (GSH), na reacção catalisada pela GPX; por sua vez, a GSH é regenerada pela GR a partir da GSSG formada na redução do H_2O_2 a H_2O pela GPX, que utiliza a GSH como substrato redutor (Apel e Hirt, 2004). Através deste processo, os níveis de GSH são mantidos e a homeostase intracelular é controlada (Mittler, 2002).

4.6.4. Levedura *Lachancea thermotolerans*

Na figura 10 encontram-se os resultados obtidos relativos à determinação da actividade enzimática das enzimas APX, CAT, GPX, GR, SOD na levedura *L. thermotolerans* EVN 372.

Pela análise dos gráficos da figura 10 (a), (c) observa-se que actividade enzimática da APX e da GPX aumenta significativamente ($p < 0,05$) com a aplicação de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Se, e em resposta oposta a GR (Figura 10 d) diminui significativamente com o aumento do teor de Se.

Verifica-se também que o selénio afectou significativamente a actividade da SOD (Figura 10 e), ou seja, com o aumento da concentração de selénio houve um aumento da actividade da SOD, que poderá estar relacionado com o aumento de H_2O_2 .

Constata-se que a aplicação de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Se não afectou significativamente a CAT (Figura 10 b), mas para a concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ verificou-se uma inibição acentuada da sua actividade, tal como foi observado nas leveduras das espécies *S. cerevisiae* (Figura 7 b) e *H. uvarum* (Figura 8 b) na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Relativamente à actividade enzimática da GR (Figura 10 d), esta diminuiu significativamente e tal como o verificado na levedura da espécie *H. uvarum* na figura 8, provavelmente não existe suficiente GR activa, e a regeneração da glutathiona que suporta o mecanismo de remoção do H_2O_2 por estes sistemas enzimáticos poderá não ser suficientemente eficaz. Neste caso, e dado que se verificou um aumento significativo da SOD, a actividade desta enzima poderá ter sido suficiente para a remoção de H_2O_2 .

A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra os ROS sendo responsável pela dismutação de $\text{O}_2^{\bullet-}$, formando-se H_2O_2 que é posteriormente eliminado pela CAT ou através

da APX, provavelmente neste caso será pela APX uma vez que ocorre um aumento significativo da sua actividade (Gechev *et al.*, 2006).

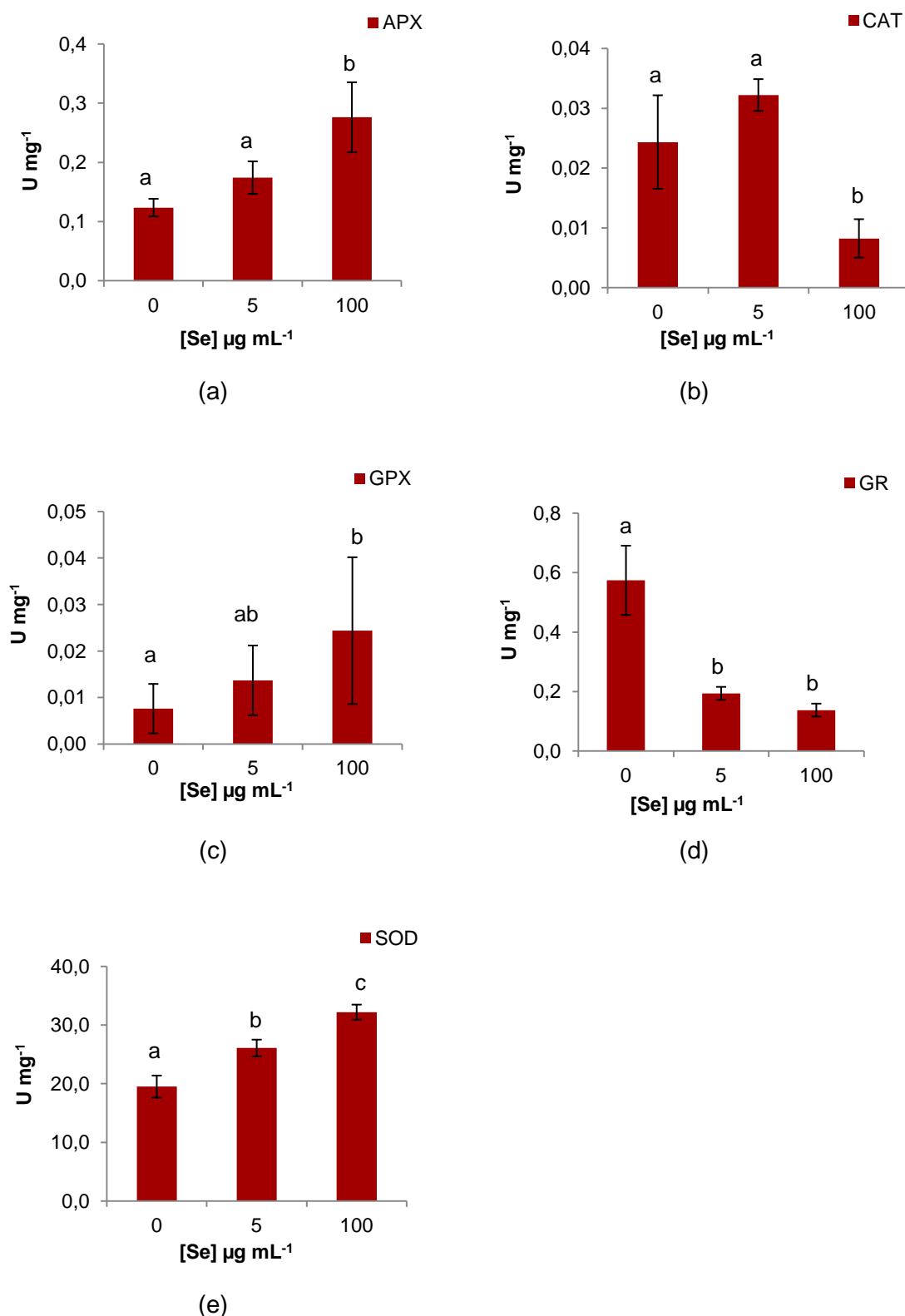


Figura 10 – Actividade enzimática da (a) APX, (b) CAT, (c) GPX, (d) GR, (e) SOD na levedura *L. thermotolerans* EVN 372. As barras de erro representam as médias \pm desvio padrão dos triplicados realizados. Diferentes letras indicam as diferenças significativas para um nível de significância de 95 % ($p < 0,05$).

4.6.5. Levedura *Candida zemplinina*

Na figura 11 encontram-se os resultados obtidos relativos à determinação da actividade enzimática das enzimas CAT, GPX, GR, SOD na levedura *C. zemplinina* EVN 1154.

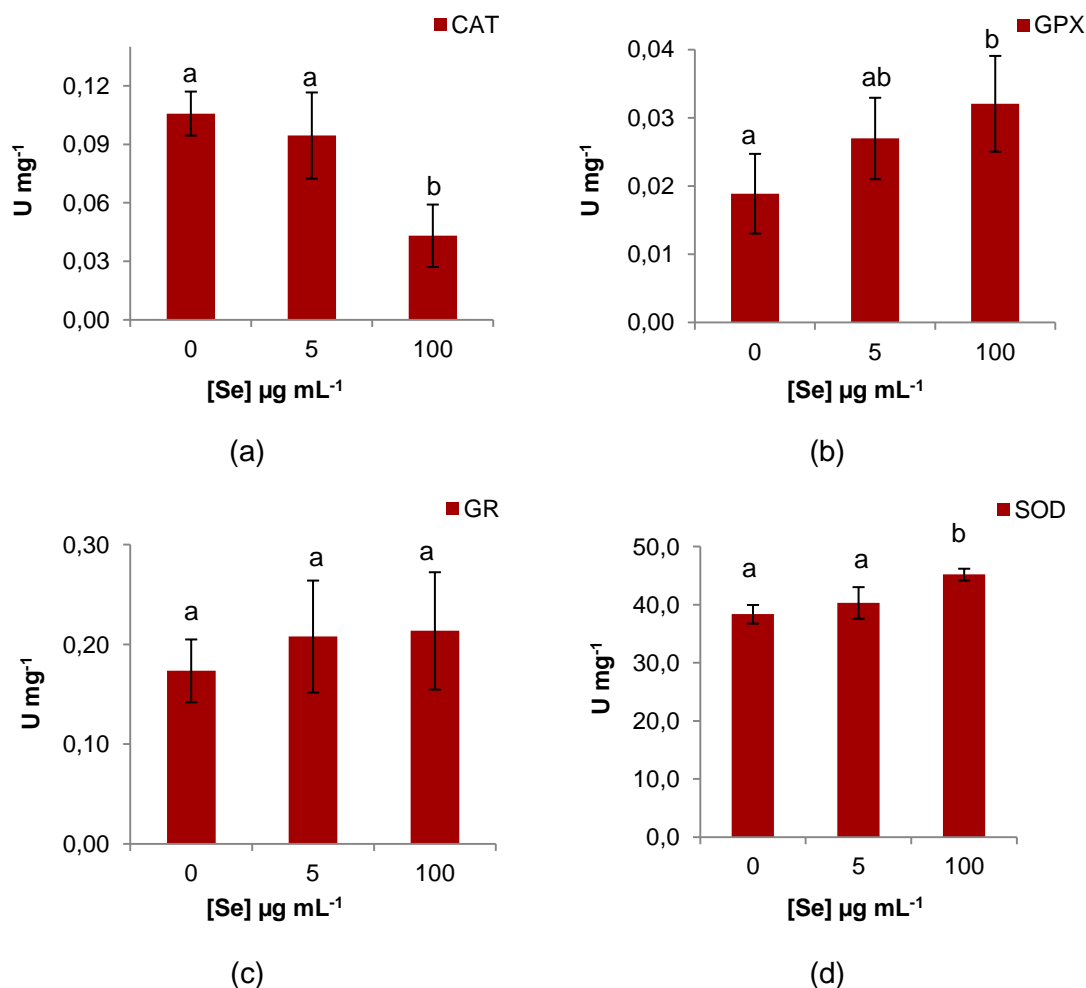


Figura 11 – Actividade enzimática da (a) CAT, (b) GPX, (c) GR, (d) SOD na levedura *C. zemplinina* EVN 1154. As barras de erro representam o desvio padrão dos triplicados realizados. Diferentes letras indicam as diferenças significativas para um nível de significância de 95 % ($p < 0,05$).

Pela análise dos gráficos da figura 11 observa-se que na enzima CAT a concentração de 5 µg mL⁻¹ de Se não afectou significativamente a CAT, enquanto que a concentração de 250 µg mL⁻¹ de Se provocou uma inibição acentuada da sua actividade.

Relativamente a actividade enzimática da GPX e da SOD (Figura 11 b, d) aumenta à medida que aumenta a concentração de Se. Na actividade da GR (Figura 11 c), apesar do selénio

induzir um ligeiro aumento, a exposição das células ao selénio não teve efeitos significativos.

Nesta levedura não foi detectada a actividade da APX. Não foi possível obter informação na literatura sobre a não existência da actividade que justificasse a não detecção da APX neste ensaio. Embora a actividade da APX constitua um importante mecanismo relacionado com a remoção do excesso de ROS em outros organismos, aparentemente nestas leveduras isto não acontece. Neste caso, e dado que se verificou um aumento da SOD (Figura 11 d), a actividade desta enzima poderá ter sido suficiente para a remoção de H_2O_2 , coadjuvada com a acção das restantes enzimas que para além de actuarem na remoção do H_2O_2 , actuam ainda na regeneração da glutathiona, como a GPX e a GR (Perrone *et al.*, 2008; Mittler, 2002). De facto, a GPX (Figura 11 b) aumenta significativamente e embora não se verifique um aumento significativo da GR (Figura 11 c), os níveis de actividade desta enzima mantêm-se contantes mesmo para a concentração de Se mais alta utilizada no ensaio.

4.6.6. Levedura *Hanseniaspora guilliermondii*

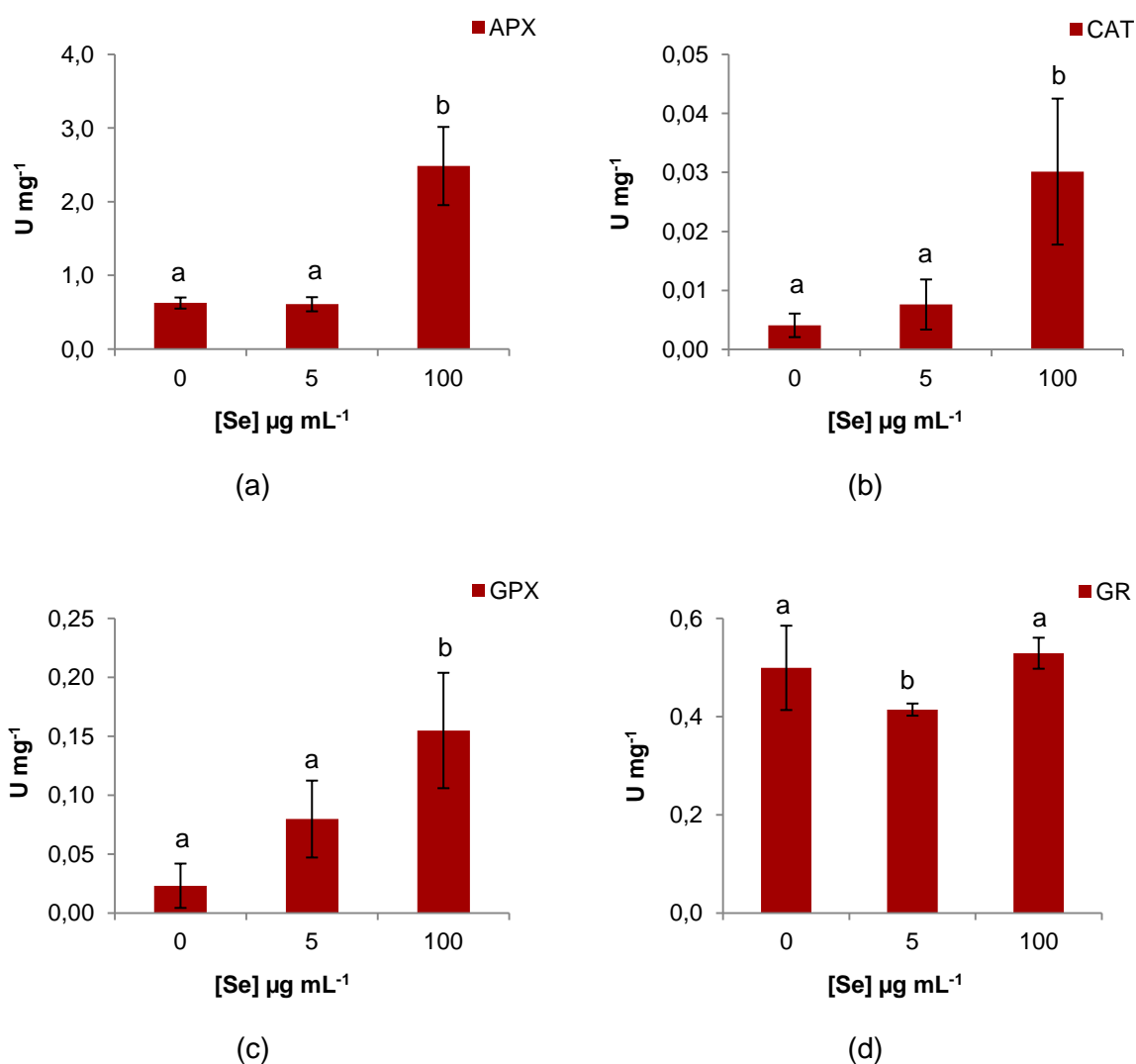
Na figura 12 encontram-se os resultados obtidos relativos à determinação da actividade enzimática das enzimas APX, CAT, GPX, GR, SOD na levedura *H. guilliermondii* EVN 390.

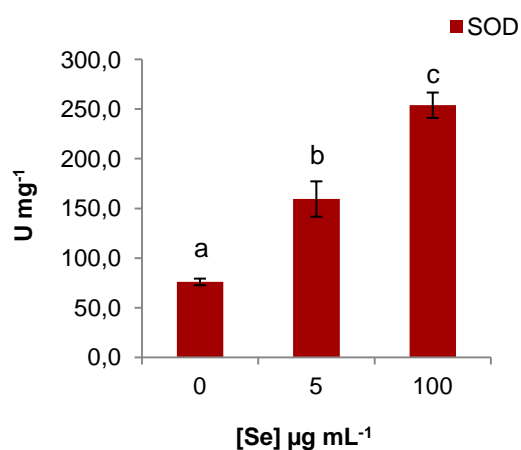
Observa-se um aumento da actividade enzimática em todas as enzimas estudadas, com o aumento da concentração de selénio o que poderá estar relacionado com o aumento dos níveis intracelulares de H_2O_2 . Embora tenha ocorrido activação da actividade destas enzimas, quando comparadas, mostrou ser superior na SOD (Figura 12 e) tendo ocorrido um aumento significativo da sua actividade, revelando o papel importante desta enzima na remoção do H_2O_2 , ao contrário do que se verificou anteriormente para a levedura da espécie *H. uvarum* (Figura 8) e para a levedura da espécie *T. delbrueckii* (Figura 9).

Ao contrário das outras leveduras estudadas, a levedura da espécie *H. guilliermondii* é a única em que a concentração de $100 \mu g mL^{-1}$ induziu significativamente a actividade enzimática da CAT (Figura 17 b). Parece que a CAT nesta levedura está envolvida no mecanismo de remoção do H_2O_2 formado em consequência do stresse induzido pelo Se (Mittler, 2002).

Para a levedura da espécie *H. guilliermondii* verificou-se nas curvas de crescimento na figura 5 uma resposta mais lenta, e a tolerância pode ser explicada pela activação de mecanismos enzimáticos de defesa antioxidante, para todas as enzimas estudadas, pelo que a tolerância verificada pode resultar do efeito conjunto dos mecanismos da enzima SOD e do ciclo glutathiona-ascorbato.

Nesta levedura para além da enzima SOD que é considerada a primeira linha de defesa contra as ROS sendo responsável pela dismutação de $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , um outro mecanismo parece estar presente nesta levedura na remoção do H_2O_2 , o ciclo glutathiona-ascorbato. Este ciclo envolve reacções sucessivas de oxidação e redução, em que a APX utiliza duas moléculas de AsA para a redução do H_2O_2 a H_2O , com formação de duas moléculas de monodesidroascorbato (MDHA). Este radical pode ser directamente reduzido a ascorbato pela enzima MDHAR (monodesidroascorbato-redutase) utilizando o NADPH como poder redutor, ou sofrer uma dismutação e formar desidroascorbato (DHA). O DHA é reduzido a ascorbato pela acção da DHAR, que utiliza a glutathiona reduzida (GSH) como substrato redutor. Esta reacção origina glutathiona no estado oxidado (GSSG), que é novamente reduzida a GSH pelo NADPH, numa reacção catalisada pela enzima GR. Esta enzima participa também na regeneração da GSSG formada na redução do H_2O_2 a H_2O pela GPX, que utiliza a GSH como substrato redutor (Apel e Hirt, 2004).





(e)

Figura 12 – Actividade enzimática da (a) APX, (b) CAT, (c) GPX, (d) GR, (e) SOD na levedura *H. guilliermondii* EVN 390. As barras de erro representam as médias \pm desvio padrão dos triplicados realizados. Diferentes letras indicam as diferenças significativas para um nível de significância de 95 % ($p < 0,05$).

Em suma, todos estes resultados indicam que existem mecanismos diferentes de tolerância nas seis espécies de leveduras em relação ao efeito tóxico do selénio. As células de levedura apresentam várias respostas face à presença de ROS que depende da concentração de selénio aplicada.

A indução da actividade da APX, SOD e GPX, parece não ter sido suficiente para evitar a ocorrência de danos proteicos, dado que relativamente ao teor em proteína solúvel foram verificados decréscimos significativos com o aumento da concentração de selénio.

Relativamente à função fisiológica desta enzima, em situações de stresse a APX utiliza o H_2O_2 como substrato pelo que é frequente verificar-se um aumento dos níveis de actividade desta enzima em correlação com possíveis aumentos deste composto. Contudo, segundo Mittler (2002) a enzima APX deverá estar mais associada a funções de sinalização, sendo menos eficiente na remoção desta espécie de ROS, comparativamente com a CAT, por exemplo.

Em todas as leveduras, com excepção das leveduras da espécie *H. uvarum* e *T. delbrueckii*, a enzima superóxido-dismutase aumentou a sua actividade à medida que a concentração de selénio aumentou. De facto a enzima SOD é extremamente sensível a agentes de stresse indutores de radicais superóxido como o selénio. De acordo com Hatfield *et al.* (2006), a exposição da mitocôndria ao selénio resulta no aumento significativo da SOD que poderá estar relacionado pelo facto de certos compostos de selénio reagirem com GSH intracelular produzindo superóxido.

A GR actua principalmente na regeneração dos substratos utilizados pelas peroxidases, particularmente pela glutathiona-peroxidase que utiliza electrões provenientes da GSH na redução do H_2O_2 a H_2O . A actividade da GPX também aumentou à medida que se aumentou a concentração de Se. Kaur e Bansal, (2006) verificaram também que a actividade da glutathiona-peroxidase em células da levedura *S. cerevisiae* aumentava com o aumento da concentração de selénio (concentrações de selénio de 19,9; 39,0 e 57,0 μM),

Os resultados deste estudo parecem indicar que a glutathiona é induzida pela presença do Se e parece fundamental para a tolerância ao stresse nas leveduras. Para confirmar esta hipótese será necessário no futuro efectuar a determinação da glutathiona intracelular.

Com os resultados da avaliação da tolerância das seis estirpes de leveduras *C. zemplinina* EVN 1154, *H. guilliermondii* EVN 390, *H. uvarum* EVN 1117, *L. thermotolerans* EVN 372, *S. cerevisiae* EVN 166 e *T. delbrueckii* EVN 1141 e com avaliação do efeito do selénio na actividade enzimática das enzimas CAT, GR, SOD, APX e GPX foi possível seleccionar as duas leveduras mais tolerantes ao selénio, a levedura *S. cerevisiae* EVN 166 e a levedura *T. delbrueckii* EVN 1141, para os ensaios de fermentação em mosto.

4.7. Fermentação

Foram realizadas fermentações em mosto da casta Seara Nova (concentração de açúcares presente no mosto era 217,7 g L^{-1}) com as leveduras *S. cerevisiae* EVN 166 e *T. delbrueckii* EVN 1141 em duas modalidades, sem selénio (Sc 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Se; Td 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Se) e pré-enriquecidas em meio com 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selénio (Sc 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Se; Td 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Se). O objectivo deste ensaio de fermentação foi avaliar a eficiência da fermentação com leveduras pré-enriquecidas em selénio, bem como a transferência de Se para o meio. As fermentações foram realizadas em triplicado.

O pré-enriquecimento das células de levedura foi realizado em meio de cultura YEPD adicionado de Na_2SeO_3 (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Este meio foi inoculado com uma concentração de inóculo de aproximadamente 10^7 células de levedura por mL a partir da suspensão de células previamente crescidas em meio YEPD, 24 h. O pré-enriquecimento decorreu durante 48 h, a 25°C e sob agitação (120 rpm).

O ensaio de fermentação foi iniciado com a inoculação da suspensão de células de levedura pré-enriquecidas com selénio e sem selénio, em frascos contendo 300 mL de mosto. A fermentação decorreu durante 25 dias, a 25 °C sem agitação. Na tabela 10 encontram-se os resultados da contagem do número de células viáveis presentes no mosto após inoculação da réplica 1 de cada triplicado.

Tabela 10 – Número de células viáveis no mosto após inoculação.

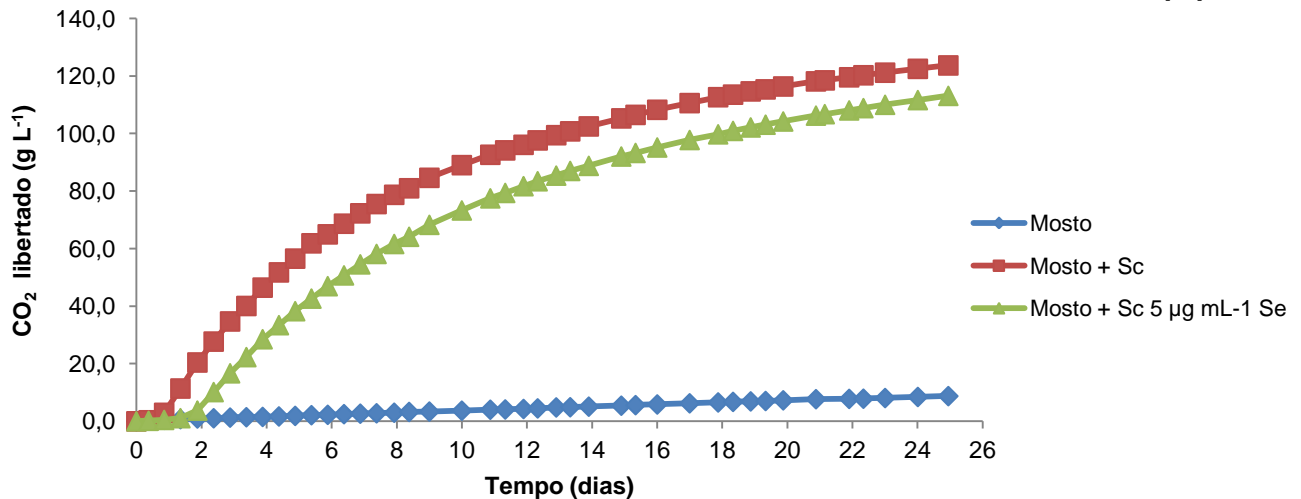
| Ensaio | UFC mL ⁻¹ |
|-----------------------------|------------------------|
| Sc 0 µg mL ⁻¹ Se | 4,91 × 10 ⁷ |
| Sc 5 µg mL ⁻¹ Se | 2,27 × 10 ⁷ |
| Td 0 µg mL ⁻¹ Se | 1,38 × 10 ⁸ |
| Td 5 µg mL ⁻¹ Se | 3,27 × 10 ⁷ |

4.7.1. Curvas de fermentação

A fermentação foi monitorizada através de duas pesagens diárias durante os 25 dias em que decorreu a fermentação, e para controlo foi usado um frasco contendo 300 mL de mosto sem inoculação. Uma vez que a perda de peso é uma medida indirecta da quantidade de CO₂ produzido, as curvas de fermentação apresentadas na figura 13 (A) e (B), correspondem à conversão da acumulação da perda de peso (g) em CO₂ (g L⁻¹) libertado. A perda de peso corresponde à fermentação dos açúcares, existentes no mosto, conduzida pela acção das leveduras. As leveduras convertem os dois principais açúcares solúveis presentes no mosto de uva, glicose e frutose em etanol (C₂H₅OH) e dióxido de carbono (CO₂) e produtos secundários (Berthels *et al.*, 2004).

Todos os dados correspondem à média dos valores obtidos em fermentações em triplicado.

(A)



(B)

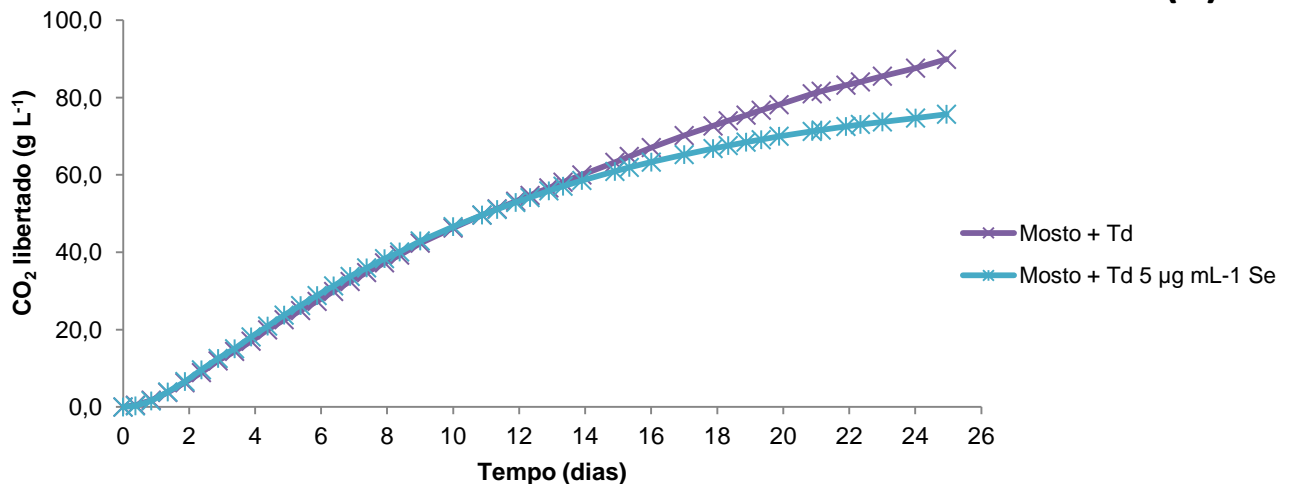


Figura 13 – Curvas de fermentação do mosto com a levedura (A) *S. cerevisiae* EVN 166 e (B) *T. delbrueckii* EVN 1141 sem selênio e pré-enriquecidas em Se.

Comparando os resultados obtidos do mosto com levedura *S. cerevisiae* sem selênio e pré-enriquecida com $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Se na figura 13 (A), observa-se uma perda significativa de peso entre o 2º e o 10º dia de fermentação sendo mais acentuada no caso da levedura *S. cerevisiae* sem selênio. A partir do 10º dia, a perda de peso diária foi mais lenta, atingindo-se um patamar que corresponde à fase estacionária.

Relativamente à perda de peso durante a fermentação do mosto com a levedura *T. delbrueckii* sem selênio e com pré-enriquecimento em selênio representada na figura 13 (B), não se observam diferenças significativas até ao 14º dia entre as duas modalidades ensaiadas e ambas apresentaram um comportamento idêntico. Após o 14º dia de fermentação ocorre uma perda de peso mais acentuada no mosto com levedura *T. delbrueckii* sem selênio.

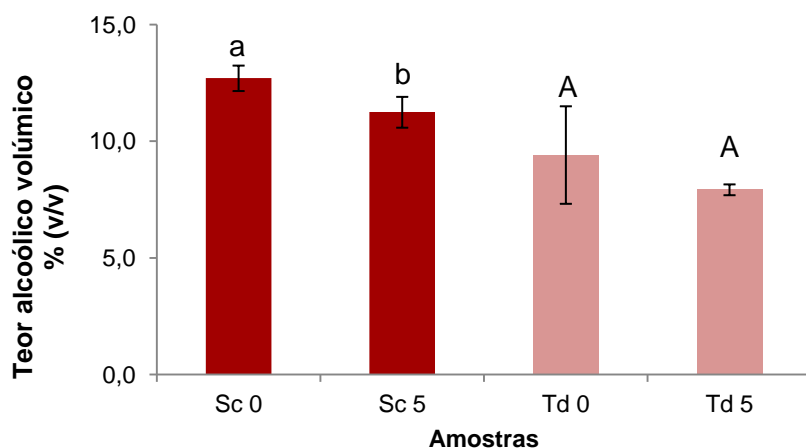
A levedura *S. cerevisiae* mostrou maior actividade, atingindo o máximo de CO₂ libertado de 123,7 g L⁻¹ na modalidade sem pré-enriquecimento e de 113,1 g L⁻¹ com pré-enriquecimento em selénio. Enquanto a fermentação com levedura *T. delbrueckii* apresenta menor actividade, atingindo o máximo de CO₂ libertado de 89,9 g L⁻¹ e 75,7 g L⁻¹ respectivamente com a levedura sem selénio e com pré-enriquecimento em selénio.

Em geral, a fermentação do mosto com a levedura *T. delbrueckii* foi mais lenta em comparação com a fermentação do mosto com a levedura da espécie *S. cerevisiae*, revelando esta última ser mais eficiente, quer na levedura sem selénio quer com pré-enriquecimento em selénio. O facto da levedura *T. delbrueckii* ter tido uma fermentação mais lenta pode estar relacionado com o facto das leveduras não-*Saccharomyces* apresentarem uma menor tolerância ao etanol, normalmente com valores de tolerância de aproximadamente 6 % (v/v) de etanol (Pina *et al.*, 2004; Ciani *et al.*, 2006).

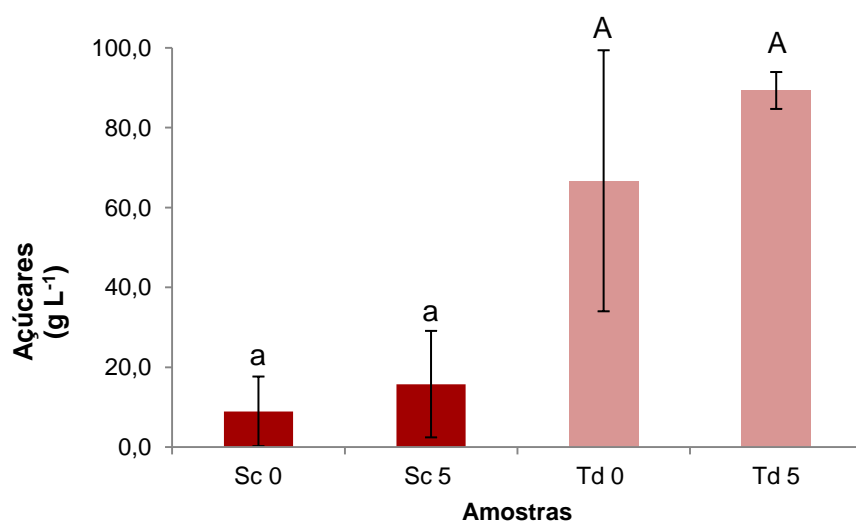
4.7.2. Análise dos parâmetros físico-químicos do mosto fermentado

De modo a avaliar o produto final da fermentação foram retiradas amostras ao 25º dia de fermentação para determinação dos açúcares (g L⁻¹), teor alcoólico volúmico (% v/v), pH, acidez total (g ácido tartárico L⁻¹) e acidez volátil (g ácido acético dm⁻³). As análises foram realizadas por FTIR. Todos os dados correspondem à média dos valores obtidos nas três repetições do ensaio.

Na figura 14 encontram-se os resultados obtidos relativos à determinação da concentração de açúcares (g L⁻¹) e do teor alcoólico volúmico (% v/v) do mosto fermentado com leveduras da espécie *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii* nas duas modalidades, sem selénio (Sc 0 e Td 0) e pré-enriquecidas em meio com 5 µg mL⁻¹ selénio (Sc 5 e Td 5).



(a)



(b)

Figura 14 – (a) Teor alcoólico volúmico (% v/v) e o (b) Concentração de açúcares (g L^{-1}) no mosto fermentado com as leveduras *S. cerevisiae* EVN 166 e *T. delbrueckii* EVN 1141 sem selênio (Sc 0 e Td 0) e pré-enriquecidas em selênio (Sc 5 e Td 5) após 25 dias de fermentação. As barras de erro representam as médias \pm desvio padrão dos triplicados realizados. As letras minúsculas indicam as diferenças significativas para um nível de significância de 95 % ($p < 0,05$) na levedura *S. cerevisiae*. As letras maiúsculas indicam as diferenças significativas para um nível de significância de 95 % ($p < 0,05$) na levedura *T. delbrueckii*.

Pela análise do gráfico da figura 14 (a) observa-se que o mosto fermentado que apresenta um teor alcoólico volúmico (% v/v) mais elevado é o da levedura *S. cerevisiae* EVN 166. Verifica-se que o mosto fermentado com a levedura pré-enriquecida em Se apresenta um menor teor alcoólico volúmico, o que indica que o selénio provavelmente afectou significativamente o teor alcoólico volúmico do mosto fermentado.

Em relação ao mosto fermentado com a levedura *T. delbrueckii* verifica-se que apesar do teor alcoólico volúmico ser menor no mosto fermentado com levedura pré-enriquecida em selénio, o selénio não teve efeitos significativos nesta redução.

Relativamente à concentração de açúcar (g L^{-1}) presente após 25 dias de fermentação observa-se que é superior no mosto fermentado com a levedura *T. delbrueckii* EVN 1141 qualquer que seja a modalidade, indicando que a taxa de degradação dos açúcares é menor na levedura *T. delbrueckii* relativamente à levedura *S. cerevisiae* (figura 14 b).

No mosto fermentado com a levedura *S. cerevisiae*, a concentração de açúcares no mosto fermentado é ligeiramente maior com leveduras pré-enriquecida em selénio, contudo este aumento não é significativo.

O teor de etanol está relacionado com o teor de açúcares presentes no mosto e com a capacidade fermentativa das leveduras em converter esse açúcar em etanol. O vinho obtido com a levedura *S. cerevisiae* foi o que apresentou uma menor concentração de açúcares e consequentemente um maior teor alcoólico volúmico.

Em geral o mosto fermentado com as leveduras *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii* pré-enriquecidas em selénio apresentaram maior concentração de açúcares e menor teor alcoólico volúmico, o que indica que o Se afectou a capacidade fermentativa das leveduras.

Na figura 15 encontram-se os resultados obtidos relativos à determinação do pH (a), acidez total ($\text{g ácido tartárico L}^{-1}$) (b) e acidez volátil ($\text{g ácido acético dm}^3$) (c) do mosto fermentado com as leveduras *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, nas duas modalidades de ensaio (sem selénio (Sc 0 e Td 0) e pré-enriquecidas em selénio (Sc 5 e Td 5)).

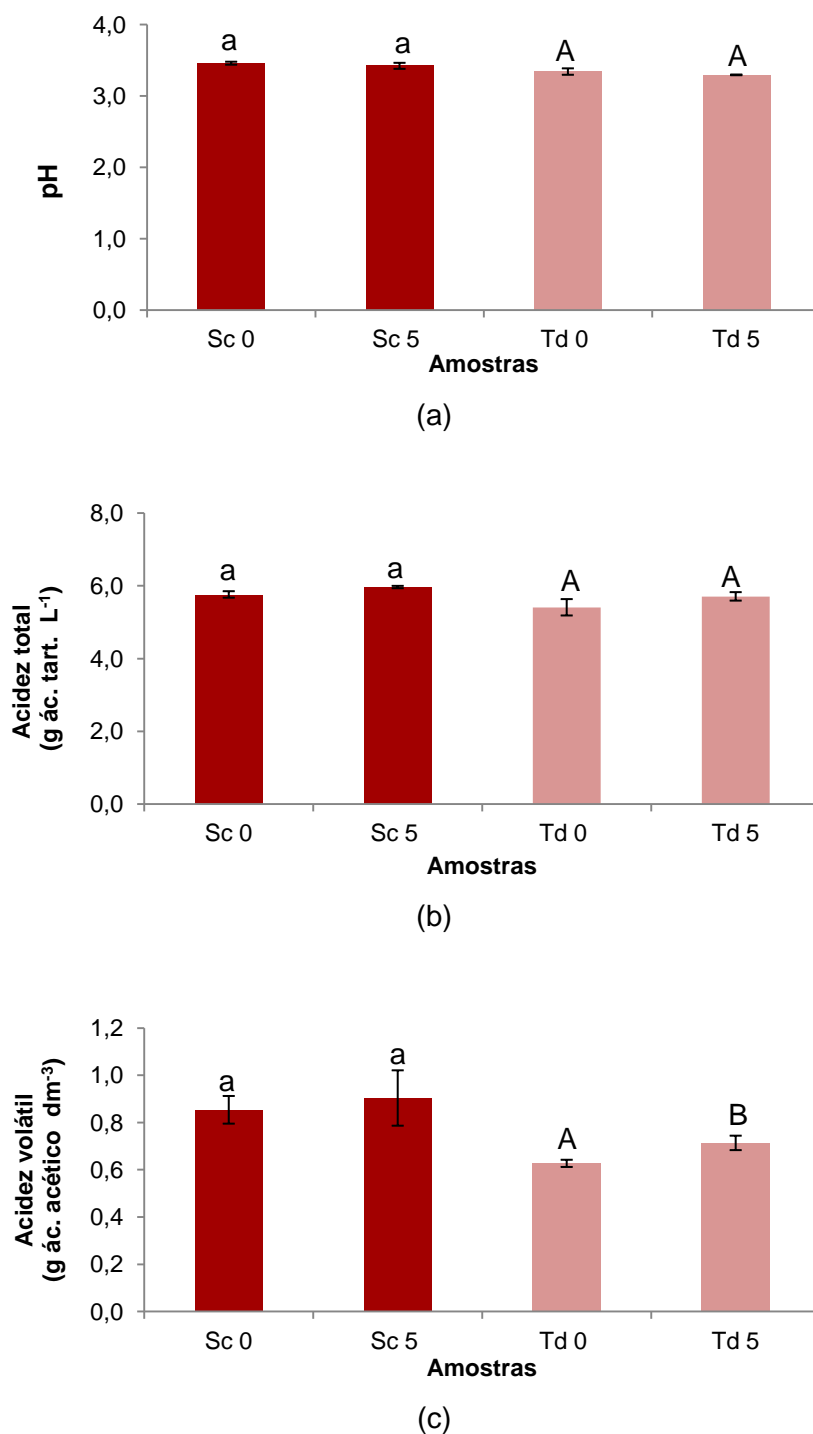


Figura 15 – (a) pH; (b) acidez total (g ác. tart. L⁻¹) e (c) acidez volátil (g ác. acético L⁻¹) no mosto fermentado com as leveduras *S. cerevisiae* EVN 166 e *T. delbrueckii* EVN 1141 sem selênio (Sc 0 e Td 0) e pré-enriquecidas em selênio (Sc 5 e Td 5) após 25 dias de fermentação. As barras de erro representam as médias \pm desvio padrão dos triplicados realizados. As letras minúsculas indicam as diferenças significativas para um nível de significância de 95 % ($p < 0,05$) na levedura *S. cerevisiae*. As letras maiúsculas indicam as diferenças significativas para um nível de significância de 95 % ($p < 0,05$) na levedura *T. delbrueckii*.

Pela análise do gráfico da figura 15 (a) o pH do mosto fermentado é idêntico qualquer que seja a levedura. No entanto o mosto fermentado com as leveduras *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii* pré-enriquecidas em selénio apresentou um pH ligeiramente mais baixo comparativamente ao obtido com leveduras sem pré-enriquecimento, contudo esta diminuição não é significativa, o que indica que aparentemente o selénio não afecta o pH.

Em relação à acidez total (figura 15 b) verifica-se que é ligeiramente mais elevada no mosto fermentado com a levedura *S. cerevisiae*. O valor da acidez nos ensaios com as leveduras pré-enriquecidas em Se é ligeiramente mais elevado comparativamente com o das leveduras sem Se, contudo este aumento não é significativo.

Relativamente à acidez volátil (figura 15 c) observa-se que o mosto fermentado com a levedura *S. cerevisiae* apresenta um valor mais elevado comparativamente com o da levedura *T. delbrueckii*. Da observação da figura 15 (c) também se constata que aparentemente o selénio não afecta a acidez volátil.

O mosto fermentado com a levedura *T. delbrueckii* pré-enriquecida em Se, comparativamente com o mosto fermentado com a levedura *T. delbrueckii* sem selénio, apresenta maior acidez o que indica que o selénio afectou significativamente a acidez volátil. De acordo com Bely *et al.* (2008) a quantidade de acidez volátil produzida pela levedura *S. cerevisiae* é geralmente baixa ($0,25 - 0,50 \text{ g ácido acético L}^{-1}$) mas pode ser maior sob certas condições de fermentação, como por exemplo durante a fermentação com elevada quantidade de açúcar. Estes autores verificaram que em ensaios de fermentação a levedura *S. cerevisiae* apresentava valores mais elevados de acidez volátil, produzindo cerca de $1,00 \text{ g ácido acético L}^{-1}$, enquanto a levedura *T. delbrueckii* atingia valores de acidez volátil da ordem de $0,56 \text{ g ácido acético L}^{-1}$ (Bely *et al.*, 2008).

4.7.3. Determinação do Se total no mosto fermentado

Este ensaio teve como objectivo avaliar a quantidade de selénio transferido para o mosto após a fermentação. Para o efeito foi determinado a concentração de selénio no mosto no tempo zero (t_0) e no mosto fermentado com as leveduras *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii* pré-enriquecidas em selénio após 25 dias de fermentação.

As amostras de mosto recolhidas no t_0 e de mosto fermentado com as leveduras *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii* ao fim de 25 dias foram digeridas por via húmida com vista à análise elementar por ICP-MS.

As determinações foram realizadas em amostras obtidas nos triplicados de fermentação e para cada amostra foi preparada em duplicado.

Na figura 16 encontram-se as médias das concentrações de selénio obtidas no mosto testemunha sem inoculação (M) e no mosto fermentado com as leveduras *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii* pré-enriquecidas em selénio (Sc 5, Td 5).

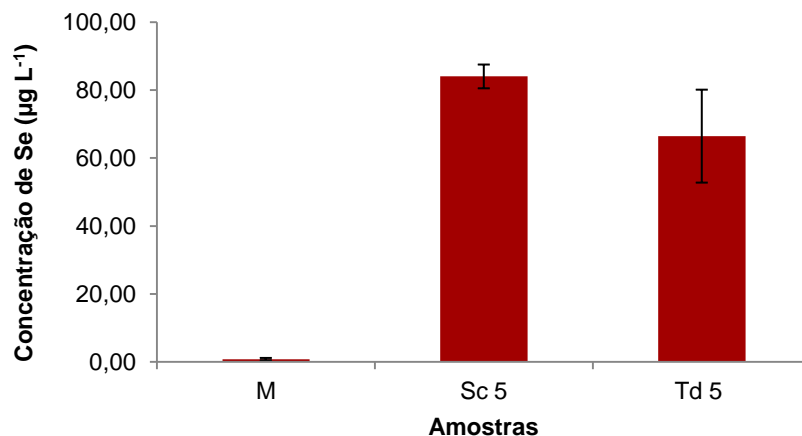


Figura 16 – Concentração de selénio ($\mu\text{g L}^{-1}$) no mosto sem inoculação e no mosto fermentado com as leveduras *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii* pré-enriquecidas em selénio. As barras de erro representam as médias \pm desvio padrão dos triplicados realizados.

A análise da figura 16 permite concluir que a concentração de selénio presente inicialmente no mosto sem inoculação é desprezável. Nas amostras do mosto fermentado com as leveduras *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii* a concentração de selénio foi de $84,01 \mu\text{g L}^{-1}$ e $66,43 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. De acordo com as curvas de fermentação representadas na figura 13 (A) e (B) a fermentação do mosto com levedura *T. delbrueckii* foi mais lenta em comparação com a fermentação do mosto com levedura *S. cerevisiae*. Verifica-se que a evolução da fermentação parece ter influência na concentração final de selénio no meio, uma vez que o mosto com a levedura *S. cerevisiae* em que houve uma fermentação mais rápida foi o que apresentou uma maior concentração de selénio.

Normalmente o teor deste elemento no vinho é inferior a $2 \mu\text{g L}^{-1}$, havendo no entanto registos de concentrações até $26 \mu\text{g L}^{-1}$ (Catarino, 2006 citando Eschnauer, 1982a; Eschnauer *et al.*, 1989a; Greenough *et al.*, 1997; Jaganathan e Dugar, 1998). Não existe um limite máximo estabelecido pelo OIV (International Organisation of Vine and Wine) para a presença de selénio no vinho. No entanto para exportação de vinhos de Portugal para África do Sul o limite máximo permitido de selénio é de 1 mg L^{-1} (Instituto da Vinha e do Vinho, 2011). Tendo em conta este limite, verificou-se que todas as amostras se encontram abaixo do limite imposto, pelo que este processo pode ser utilizado nas quantidades de Se testadas.

A dose diária recomendada de selênio para homens e mulheres é de cerca 55 µg/dia (Pedrero e Madrid, 2009). Apesar destes ensaios serem apenas experimentais, se considerarmos que uma pessoa ingere um copo de vinho por dia (120 mL), o vinho obtido com a levedura *S. cerevisiae* pré-enriquecida em Se, permitiria um consumo de cerca de 10,08 µg de selênio, o que corresponde a 18 % da DDR.

5. CONCLUSÃO

Nos ensaios preliminares de tolerância da levedura *Saccharomyces cerevisiae* EVN 166 em diferentes concentrações de Se ($0 \mu\text{g mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, $5\,000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $25\,000 \mu\text{g mL}^{-1}$) ocorreu uma diminuição acentuada no número de células viáveis nas concentrações de $5\,000$ e $25\,000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Enquanto na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Se apesar de haver uma redução do número de células viáveis de uma potência de 10, ainda existe resistência da levedura da espécie *S. cerevisiae* a esta concentração.

Os ensaios de viabilidade celular realizados em seis estirpes de leveduras, *C. zemplinina* EVN 1154, *H. guilliermondii* EVN 390, *H. uvarum* EVN 1117, *L. thermotolerans* EVN 372, *S. cerevisiae* EVN 166 e *T. delbrueckii* EVN 1141 na presença de concentrações crescentes de Se ($0 \mu\text{g mL}^{-1}$, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$), demonstraram que todas as leveduras são capazes de crescer nas condições ensaiadas. A levedura mais tolerante ao selênio é a *T. delbrueckii* EVN 1141, atingindo valores máximos de D.O. em cerca de 10 h. A levedura da espécie *H. guilliermondii* apresenta uma fase de latência extensa nas diferentes concentrações ensaiadas, atingindo no entanto o mesmo nível de crescimento celular que as restantes leveduras. A levedura da espécie *H. uvarum* demonstrou ser a mais sensível ao Se apresentando valores muito baixos de densidade óptica (cerca de 0,4) na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Se.

A determinação dos teores de proteína e da actividade das enzimas antioxidativas permitiu concluir que a resposta ao selênio está relacionada com diferentes mecanismos enzimáticos, provavelmente envolvidos na remoção de ROS. Os níveis de actividade enzimática de resposta ao selênio variam entre as espécies para as concentrações testadas. As leveduras que apresentaram melhor resposta ao selênio foram as leveduras *S. cerevisiae* EVN 166 e a *H. guilliermondii* EVN 390. Na levedura da espécie *S. cerevisiae* as enzimas envolvidas no mecanismo de resposta ao selênio são as enzimas APX, GPX, GR, SOD que apresentaram um aumento significativo da sua actividade enzimática com o aumento da concentração de Se. A levedura da espécie *H. guilliermondii*, por outro lado, apresentou um aumento da actividade enzimática em todas as enzimas estudadas.

As fermentações em mosto com as leveduras *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* sem selênio e pré-enriquecidas em selênio, permitiram verificar que a fermentação com a primeira levedura referida foi mais lenta comparativamente com a levedura da espécie *S. cerevisiae*. O mosto fermentado com as leveduras pré-enriquecidas em selênio apresentou ao fim de 25 dias de fermentação valores superiores de concentração de açúcares e menor teor alcoólico volúmico em comparação com a fermentação utilizando leveduras sem pré-enriquecimento, o que indicia um efeito negativo do Se na capacidade fermentativa das leveduras. A concentração de açúcares totais e os níveis de etanol atingidos após os 25 dias de

fermentação levam a concluir que a levedura *S. cerevisiae* teve uma fermentação mais completa comparativamente à da levedura *T. delbrueckii*. O mosto fermentado com as leveduras *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii* sem e com pré-enriquecimento em Se apresentou valores de pH e a acidez total idênticos, pelo que aparentemente o Se não afectou estes parâmetros. Pelo contrário no mosto fermentado com a levedura *T. delbrueckii*, o pré-enriquecimento em selénio afectou a acidez volátil, aumentando significativamente o valor deste parâmetro.

Relativamente ao mosto fermentado com as leveduras pré-enriquecidas em Se, aquele que apresentou valores mais elevados de Se no final de fermentação foi o da levedura *S. cerevisiae* (cerca de $84,01 \mu\text{g L}^{-1}$), o que pode estar relacionado com o facto da fermentação ter sido mais completa, com valores de açúcares totais de $15,75 \text{ g L}^{-1}$ enquanto a fermentação com a levedura *T. delbrueckii* apresentou teores de açúcares totais de $89,31 \text{ g L}^{-1}$ no final de fermentação.

Considerações futuras:

Com o desenvolvimento deste trabalho revelaram-se algumas necessidades de eventuais linhas de investigação para trabalhos futuros.

Para perceber melhor a dinâmica da regulação dos sistemas de defesa antioxidante nestes organismos, bem como a diferente tolerância ao stresse oxidativo, é necessário desenvolver estudos de avaliação do efeito do selénio na peroxidação dos lípidos e na produção de peróxido de hidrogénio. Tendo em linha de conta que as espécies reactivas de oxigénio podem reagir com os lípidos das membranas, a peroxidação dos lípidos representa um dos principais indicadores da ocorrência de stresse oxidativo. Assim, em ensaios futuros poder-se-á avaliar também o efeito do selénio na peroxidação dos lípidos e na produção de peróxido de hidrogénio, como medida da extensão dos danos oxidativos nas membranas e o nível de ROS intracelular, respectivamente.

A identificação e a quantificação das diferentes espécies de selénio especialmente em suplementos alimentares são necessárias para saber concretamente o papel final do selénio no metabolismo humano e seu efeito na saúde humana. A biodisponibilidade nutricional, toxicidade e qualquer actividade quimiopreventiva do cancro não são apenas influenciadas pela concentração de selénio total mas também pela sua forma química, daí o interesse em estudar também a identidade da espécie nos diversos suplementos nutricionais, como seja a levedura enriquecida em selénio.

Os resultados conseguidos neste trabalho permitiram demonstrar que é possível obter e utilizar leveduras enriquecidas em selénio na fermentação de mosto de uva, abrindo caminho a futuros trabalhos de fermentação em larga escala, com vista à produção industrial de vinho enriquecido em selénio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H.E. (1983). Catalase. In: Bergmeyer (eds.), *Methods of Enzymatic Analysis, Vol III. Oxidoreductases, transferases*. Verlag, Weinheim. pp. 273-286;
- Afonso, C. e Vaz de Almeida, M. (2001). *Princípios básicos de alimentação e nutrição*. Universidade Aberta. Lisboa;
- Alzate, A., Fernández-Fernández, A. e Pérez-Conde, M.C. (2008). Comparison of biotransformation of inorganic selenium by *Lactobacillus* and *Saccharomyces* in lactic fermentation process of yogurt and kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**: 8728-8736;
- Apel, K. e Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. **55**: 373-399;
- Aravind, P. e Prasad, M. (2005). Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate–glutathione cycle and glutathione metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*. **43**: 107–116;
- Avery, S.V., Stratford, M. e West, P.V. (2008). *Stresse in yeasts and filamentous fungi*. Academic Press. USA;
- Baleiras-Couto, M., Reizinho, R. e Duarte, F. (2005). Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterize non-*Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. **102**: 49-56;
- Baptista, S. (2009). *Avaliação da resposta ao stresse oxidativo induzido por cádmio e cobre em plantas de tabaco transformadas e não transformadas*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente. Instituto Superior de Agronomia;
- Becker, K., Müllert, S., Keese, M.A., Walter, R.D., Schirmer, R.H. (1996). A glutathione reductase-like flavoenzyme of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: structural considerations based on the DNA squence. *Biochem. Soc. Trans.*. **24**: 67-72;
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I. e Dubourdieu, D. (2008). Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii* –*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. **122**: 312-320;
- Berger, M.M. (2005). Can oxidative damage be treated nutritionally?. *Clinical Nutrition*, **24**, 172-183;

- Berthels, N.J., Cordero Otero, R.R., Bauer, F.F., Thevelein, J.M. e Pretorius, I.S. (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*. **4**: 683-689;
- Blackwell, K.J., Singleton, I. e Tobin, J.M. (1995). Metal cation uptake by yeast: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **43**: 579-584;
- Bradford, M. (1976). Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**:1-2;
- Brady, D. e Duncan, J.R. (1994). Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **41**: 149-154;
- Brenneisen, P., Steinbrenner, H. e Sies, H. (2005). Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Molecular Aspects of Medicine*. **26**: 256-267;
- Bronzetti, G., Cini, M., Andreoli, E., Caltavuturo, L., Panunzio, M. e Croce, C.D. (2001). Protective effects of vitamins and selenium compounds in yeast. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **496**: 105-115;
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. e Jones, R. (2009). *Biochemistry and molecular biology of plants*. 7ª edição. American Society of Plant Physiologist;
- Casal, M., Schuller, D. e Pais, C. (2004). *Métodos moleculares de identificação de leveduras do vinho*. Microbiologia e genética molecular microbiana: manual de laboratório. Universidade do Minho;
- Catarino, S. (2006). *Metais contaminantes nos vinhos. Ocorrência por influência das bentonites*. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Agro-Industrial. Instituto Superior de Agronomia;
- Catarino, S., Trancoso, I.M., Bruno de Sousa, R. e Curvelo-Garcia, A.S. (2010). Desenvolvimento de um procedimento de mineralização de mosto para análise elementar, por digestão por microondas. *Ciência e Técnica Vitivinícola*. **25 (2)**: 87-93;
- Ciani, M., Beco L. e Comitini, F. (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, **108**: 239-245;
- Dickinson, J.R. e Schweizer, M. (2004). *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*. 2ª edição. Taylor e Francis, Ltd. Londres;
- Dostalek, P., Patzak, M. e Matejka, P. (2004). Influence of specific growth limitation on biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. *International Biodeterioration and Biodegradation*. **54**: 203-207;

- Fernandes, I. (2008). *O Selénio e sua suplementação em diversas patologias*. Monografia. Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação. Universidade do Porto;
- Figueiredo, N. (2009). *Efeito inibitório de extractos de plantas no crescimento e factores de virulência de Streptococcus sobrinus e Streptococcus mutans*. Mestrado em Bioquímica. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências;
- Fleet, G.H. (2003). Yeast interactions and wine flavor. *International Journal of Food Microbiology*, **86**: 11-22;
- Fokkink, W.B., Hill, T.M., Bateman II, H.G., Aldrich, J.M. e Schlotterbeck, R.L. (2009). Selenium yeast for dairy calf feeds. *Animal Feed Science and Technology*. **153**: 228–235;
- Francisco, D. (2008). *Acção antimicrobiana de sobrenadantes mistos S. cerevisiae/H. guilliermondii em leveduras não-Saccharomyces. Estudo do efeito inibitório da fracção proteica*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Lisboa;
- Fugelsang, K.C. e Edwards, C.G. (2007). *Wine microbiology. Practical applications and procedures*. 2ª edição, Springer science.
- Garnczarska, M. (2005). Response of the ascorbate-glutathione cycle to re-aeration following hypoxia in lupine roots. *Plant Physiology and Biochemistry*. **43**: 583-590;
- Gechev, T.S., Breusegem, F.V., Stone, J.M., Denev, I. e Laloi, C. (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays*. **28**: 1091-1101;
- Gille, G., Sigler, K. (1995). Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiology*. **40**: 131-152;
- Glazer, A.N. e Nikaido, H. (2007). *Microbial biotechnology. Fundamentals of applied microbiology*. 2ª edição, Cambridge University Press. Nova Iorque;
- Hatfield, D.L, Berry, M.J. e Gladyshev, V.N. (2006). *Selenium, its molecular biology and role in Human health*. 2ª edição, Springer. Nova Iorque;
- Heick, H. M., Graff, G. L. e Humpers, J. E. (1972). The occurrence of ascorbic acid among the yeasts. *Canadian Journal of Microbiology*. **18**: 597–600;
- Hohmann, S. e Mager, W.H. (2003). *Yeast stress responses*. Springer. Nova Iorque;
- Instituto da vinha e do vinho (2011). *África do Sul, limites analíticos*. Ministério da Agricultura, Mar, Ambiente e Ordenamento do Território. Acedido em: 2, Setembro, 2011, em: <http://www.ivv.min-agricultura.pt/np4/310.html>;

- ISO 4796 (2000). *Laboratory glassware – Bottles*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland;
- ISO 7218 (1985). *Microbiology – General guidance for microbiological examinations*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland;
- Jamieson, D.J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **14**: 1511-1527;
- Juniper, D.T., Phipps, R.H., Ramos-Morales, E. e Bertin, G. (2008). Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in beef cattle. *American Society of Animal Science*. **86**: 3100-3109;
- Juniper, D.T., Phipps, R.H., Ramos-Morales, E. e Bertin, G. (2009). Effect of high dose selenium enriched yeast diets on the distribution of total selenium and selenium species within lamb tissues. *Livestock Science*. **122**: 63-67;
- Kaur, T. e Bansal, M.P. (2006). Selenium enrichment and anti-oxidant status in baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* at different sodium selenite concentrations. *Nutrición Hospitalaria*. **21**: 704-708;
- Kurtzman, C.P. e Fell, J.W. (1998). *The yeasts, a taxonomic study*. 4ª edição, Elsevier science. Amsterdão;
- Longo, V.D., Gralla, E.B. e Valentine, J.S. (1996). Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *The journal of biological chemistry*. **271**: 12275-12280;
- Martini, A. (2003). Biotechnology of natural and winery-associated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Microbiology*, **6**: 207-209;
- Martins, M.L. e Mourato, M.P. (2008). Alterações no metabolismo de plantas em meios contaminados por metais pesados: stress oxidativo. AGROS;
- Mishra, Y., Bhargava, P., Thapar, R., Srivastava, A. e Rai, L. (2008). A comparative study of antioxidative defense system in the copper and temperature acclimated strains of *Anabaena doliolum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **24**: 2997-3004;
- Mithöfer, A., Schulze, B. e Boland, W. (2004). Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters*. **566**: 1-5;
- Mittler, R., Zilinskas, B. A. (1991). Purification and Characterization of Pea Cytosolic Ascorbate Peroxidase. *Plant Physiology*. **97**: 962 - 968;

- Moller, I.M., Jensen, P.E. e Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*. **58**: 459-481;
- National Academy of Sciences (2000). Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Acedido em: 14 de Março de 2011, em: <http://www.iom.edu/Reports/2000/Dietary-Reference-Intakes-for-Vitamin-C-Vitamin-E-Selenium-and-Carotenoids.aspx>;
- Navarre, C. (2008). *Enologia. Técnicas de produção do vinho*. 2.^a edição, Publicações Europa-América, Lda. Lisboa;
- Navarro-Alarcon, M. e Cabrera-Vique, C. (2008). Selenium in food and the human body: a review. *Science of the total environment*, **400**: 115-141;
- Pedrero, Z. e Madrid, Y. (2009). Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: a review. *Analytica Chimica Acta*, **634**: 135-152;
- Pérez-Corona, M.T., Sánchez-Martínez, M. Valderrama, M.J., Rodríguez, M.E., Cámara, C. e Madrid, Y. (2011). Selenium biotransformation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during white wine manufacture: laboratory-scale experiments. *Food Chemistry*, **124**: 1050-1055;
- Perrone, G., Tan, S. e Dawes, I. (2008). Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1783**: 1354-1368;
- Petrova, V.Y., Rasheva, T.V. e Kujumdzieva, A.V. (2002). Catalase enzyme in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*. **5**: 1-13;
- Pina, C., Santos, C., Couto, J. A. e Hogg, T. (2004). Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeast in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* influence of different culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*, **21**: 439-447;
- Pinheiro, R.I. (2004). *Estudo do efeito da pressão na fisiologia de leveduras*. Dissertação para Doutoramento em Engenharia Química e Biológica. Universidade do Minho;
- Ponce de León, C.A., Bayón, M.M., Paquin, C. e Caruso, J.A. (2002). Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods. *Journal of Applied Microbiology*. **92**: 602-610;
- Ramos, P. (2007). *Caracterização da zimobiota associada a algumas castas portuguesas*. Relatório de estágio curricular. Licenciatura em Química Aplicada – Ramo de Biotecnologia. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Dois Portos;

- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2006). *Handbook of enology. The microbiology of wine and vinifications*. Vol. 1. 2ª edição. John Wiley & Sons, Ltd. England. Pp.1-51;
- Rubio, M.C., Gonzalez, E.M., Minchin, F.R., Webb, K.J., Arrese-Igor, C., Ramos, J. e Becana M. (2002). Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases. *Physiologia Plantarum*. **115**: 531-540;
- Santoro, N., Thiele, D.J. (1997). *Oxidative stress responses in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. In: *Yeast Stress Response*. Hohmann, S., Mager, W.H. (eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, Germany;
- Scandalio, J.G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **38**: 995-1014;
- Scandalios, J. 2002. Oxidative stress responses - What have genome-scale studies taught us?. *Genome Biology*. **3**: 1–6;
- Shanker, A.K., Djanaguiraman, M., Sudhagar, R., Chandranshekar, C.N. e Pathmanabhan, G. (2004). Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek. Cv CO 4) roots. *Plant Science*. **166**: 1035-1043;
- Sharma, P. e Dubey, R.S. (2004). Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. *Plant Science*. **167**: 541-550;
- Shoeib, T. e Mester, Z. (2007). Towards the characterization of metal binding proteins in metal enriched yeast. *Microchemical Journal*. **85**: 329-340;
- Soares, E.V., Duarte, A.P., Boaventura, R.A. e Soares, H.M. (2002). Viability and release of complexing compounds during accumulation of heavy metals by a brewer's yeast. *Applied Microbiology Biotechnology*. **58**: 836-841;
- Sousa, T. (2007). *Fermentação e maceração de uvas tintas em barricas de madeira de diferentes origens e com inoculação de várias leveduras seleccionadas*. Relatório de trabalho de fim de curso de engenharia agrónoma. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa;
- Stabnikova, O., Wang, J., Ding, H. e Tay, J. (2005). Biotransformation of vegetable and fruit processing wastes into yeast biomass enriched with selenium. *Bioresource Technology*. **96**: 747-751;

- Stewart, M., Spallholz, J., Neldner, K. e Pence, B. (1999). Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*. **26**: 42-48;
- Stolz, J.F., Basu, P., Santini, J.M. e Oremland, R.S. (2006). Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annual Review of Microbiology*. **60**: 107-130;
- Suhajda, Á., Hegóczki, J., Janzsó, B., Pais, I. e Vereczkey, G. (2000). Preparation of selenium yeasts I. Preparation of selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. **14**: 43-47;
- Temple, M.D., Perrone, G.G. e Dawes, I.W. (2005). Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends in Cell Biology*. **15**: 319-326;
- Tinggi, U. (2003). Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicology Letters*. **137**: 103-110;
- Verduyn, C., Stouthamer, A.H., Scheffers, W.A., van Dijken, J.P. (1991). A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*. **59**: 49-63;
- Viana, T. (2009). *Caracterização bioenergética de Saccharomyces cerevisiae em fermentação vinária*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa;
- Vieira da Costa, V.M. (1998). *Oxidative stresse in Saccharomyces cerevisiae: molecular mechanisms of ethanol and hydrogen peroxide stresse responses*. Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto. Porto;
- Walker, G. (2009). Yeasts. *The desk encyclopedia of microbiology*. 2.^a Edição, Elsevier. San Diego, Estados Unidos da América;
- Walker, G.M. (1998). *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Wiley e Sons Ltd., West Sussex. England;
- Ward, O.P. (1991). *Biotechnologia de la fermentacion: principios, procesos y productos*. Editorial Acribia, S. A.. Zaragoza (Espanha);
- Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A. e Masneuf-Pomarede, I. (2008). Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, **125**: 197-203.

ANEXO

Anexo I – Preparação da solução Tampão Fosfato (0,1 M) e Triptona sal

1. Solução Tampão Fosfato (0,1 M)

Pesar 1,14 g de KH_2PO_4 (MM = 136,09 g) e 10,87 g de Na_2HPO_4 (MM = 141,96 g) para um balão de 500 mL. Perfazer o volume com água destilada e ajustar o pH 7,4. Colocar no frigorífico a 2 °C.

2. Solução Triptona sal

Pesar 8,5 g de cloreto de sódio e 1,0 g de triptona. Dissolver com 1000 mL de água destilada, ajustar o pH 7,0. A esterilização é feita em autoclave 121 °C durante 20 minutos.

Anexo II – Análises dos parâmetros físico-químicos do mosto

| ° Brix (% m/m) | Açúcares (g L⁻¹) | Massa volúmica (g cm⁻³) | Grau provável (% v/v) | pH | Acidez total (g L⁻¹ ác. tartárico) |
|---------------------------|--|---|----------------------------------|-----------|--|
| 22,2 | 217,7 | 1,094 | 12,8 | 3,51 | 4,0 |